



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA DE
Cosmos atrosanguineus Sherff y *Cosmos purpureus*
(DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
ORIGEN DE EXAMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

GÓMEZ PEDRAZA DIANA ERIKA

Bajo la supervisión de: Dr. Juan Martínez Solís



Junio 2018, Chapingo, Estado de México

Hibridación interespecífica de *Cosmos atrosanguineus* Sherff y
Cosmos purpureus (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl

Tesis realizada por Diana Erika Gómez Pedraza bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Juan Martínez Solís

ASESOR:



M.C. José Merced Mejía Muñoz

ASESOR:



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
DEDICATORIAS	vii
AGRADECIMIENTOS	viii
DATOS BIOGRÁFICOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Diversidad biológica del género <i>Cosmos</i>	3
2.2. <i>Cosmos atrosanguineus</i> Sherff	8
Ubicación taxonómica	8
Descripción botánica	8
Distribución geográfica	11
Protección de variedades	11
2.3. <i>Cosmos purpureus</i> (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl	12
Ubicación taxonómica	12
Descripción botánica	12
Distribución geográfica	14
2.4. Importancia del género <i>Cosmos</i> como planta ornamental	15
2.5. Genética del género <i>Cosmos</i>	15
2.6. Mejoramiento genético de <i>Cosmos</i>	18
2.7. Caracterización molecular	20
Marcadores moleculares de tipo ISSR	20

Extracción y purificación de ADN.....	21
Amplificación por PCR.....	22
Electroforesis	23
Documentación de los geles.....	24
2.8. Uso de marcadores moleculares en caracterización de híbridos.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Material vegetal de <i>Cosmos atrosanguineus</i>	26
3.2. Material vegetal de <i>Cosmos purpureus</i>	27
3.3. Hibridación interespecífica de <i>Cosmos atrosanguineus</i> y <i>Cosmos purpureus</i>	28
3.4. Extracción de ADN	28
3.5. Determinación de la cantidad y pureza del ADN	30
3.6. Obtención de patrones ISSR	31
3.7. Análisis estadístico	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
4.1. Comprobación de la naturaleza híbrida de la progenie con marcadores moleculares	33
4.2. Estimación de las relaciones genéticas entre materiales.....	36
4.3. Demostración de identidad genética de clones silvestres de <i>C. atrosanguineus</i>	40
4.4. Análisis de marcadores moleculares ISSR	41
5. CONCLUSIONES	43
6. LITERATURA CITADA	44

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies del género <i>Cosmos</i> distribuidas en México.	5
Cuadro 2. Iniciadores ISSRs utilizados, secuencia (5'-3') y temperatura de alineamiento utilizados para obtener patrones de bandeo de híbridos de <i>Cosmos atrosanguineus</i> x <i>Cosmos purpureus</i>	31
Cuadro 3. Bandas específicas de las especies <i>C. atrosanguineus</i> y <i>C. purpureus</i> y su correspondencia con el patrón de bandas de los híbridos.	35
Cuadro 4. Número de bandas totales, polimórficas, proporción de loci polimórficos, contenido de información polimórfica, error estándar, porcentaje de amplificación y probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar obtenidos con ocho iniciadores ISSR's en dos especies de <i>Cosmos</i> (<i>C. atrosanguineus</i> : clon y silvestre; <i>C. purpureus</i>) y sus seis híbridos.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Variabilidad morfológica y de colores en las flores liguladas y del disco en el género <i>Cosmos</i>	7
Figura 2. Perfiles moleculares de <i>Cosmos atrosanguineus</i> (carril 1), <i>Cosmos purpureus</i> (carril 2) y sus híbridos interespecíficos (carriles 3-5 y 7-9) obtenidos con el marcador de peso molecular.	33
Figura 3. Perfiles moleculares de <i>Cosmos atrosanguineus</i> (carril 1), <i>Cosmos purpureus</i> (Carril 2) y sus híbridos interespecíficos (carriles 3-5 y 7-9) obtenidos con el marcador de peso molecular.	34
Figura 4. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre <i>Cosmos atrosanguineus</i> , <i>Cosmos purpureus</i> y sus híbridos interespecíficos, obtenido mediante la distancia genética de Jaccard ($1 - S$) y el método de agrupamiento de ligamiento promedio ponderado.....	36
Figura 5. Color de flor del clon de Kew de <i>Cosmos atrosanguineus</i> (izquierda) y de <i>Cosmos purpureus</i> (derecha).	37
Figura 6. Color de flor de los híbridos interespecíficos M-3 (izquierda) y M-12 (derecha).	38
Figura 7. Color de flor de los híbridos interespecíficos M-6 (izquierda) y M-1 (derecha).	38
Figura 8. Forma de las hojas de <i>Cosmos atrosanguineus</i> (izquierda) y <i>Cosmos purpureus</i> (derecha).	38
Figura 9. Forma de las hojas de los híbridos interespecíficos M-12 (izquierda) y M-1 (derecha).	39
Figura 10. Ramificación del pedúnculo de <i>Cosmos purpureus</i> , planta completa (izquierda) y acercamiento a la bifurcación (derecha).	39
Figura 11. Ramificación del pedúnculo de los híbridos interespecíficos, planta completa (izquierda) y acercamiento a la bifurcación (derecha).	40
Figura 12. Color de flor de <i>C. atrosanguineus</i> clon de Kew (izquierda) y <i>C. atrosanguineus</i> procedente de Zimapán, Hgo (derecha).	41

DEDICATORIAS

A Dios por permitirme disfrutar lo bello de la vida y siempre estar a mi lado.

A mis padres: María Magdalena Pedraza Espinoza y Valente Gómez Hernández, porque han sido mi ejemplo de superación, siempre siendo mi impulso y fortaleza y que sin ellos atravesar la vereda sería más complicada.

A mis hermanos: Eric y Fernando por ser mis compañeros en los momentos difíciles y estar a mi lado en los buenos.

A mis sobrinos: Jade y Cristofer por ser la luz de mis días, por su amor incondicional y sus palabras de aliento.

A mis tíos: Sebastián Pedraza y Josefina Cerón por su guía espiritual.

A mis grandes amigos de la maestría: Karina Sandibel, Bulmaro, Isaías, Norberto y a cada uno de mis compañeros de Maestría de la generación 2016-2017 por acompañarme en esta experiencia llena de retos.

A cada uno de mis profesores que con sus palabras de ánimo me apoyaron en la culminación de esta etapa, en especial al M.C. José M. Mejía Muñoz y Dr. Juan Martínez Solís por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por darme la oportunidad de seguir con mi formación académica con la beca otorgada CVU (735963).

A mi alma máter la Universidad Autónoma Chapingo por mi formación primeramente como Ingeniera Agrónoma y posteriormente como Maestra en Ciencias y en especial al Departamento de Fitotecnia por todas las facilidades para desarrollar el proyecto de investigación.

Al Dr. Juan en la orientación y seguimiento del proyecto de investigación.

Al M. en C. José Merced Mejía Muñoz por su apoyo en la obtención del material vegetal, su guía en cultivo *in vitro* y su aportación intelectual.

A la Dra. Margarita Gisela Peña Ortega por aceptar su participación en mi comité y por el apoyo en el análisis de información genética.

Al QFB. Ricardo Gaspar Hernández y a la M. en C. María Elisa Alvarado Cano por su apoyo en la obtención de la información genética de las especies en cuestión, y su paciencia.

Al Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga por la disposición del uso de su laboratorio.

Al estudiante de licenciatura Andi López Mendoza por su apoyo en la toma de datos.

Al Ing. Claudio Flores Espinosa por la facilitación de todos los materiales requeridos.

Al señor Alfredo Batalla Salvador por su apoyo en la búsqueda y colecta de material en campo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Diana Erika Gómez Pedraza

Fecha de nacimiento: 25 de noviembre de 1993

Lugar de nacimiento: Los Reyes, La Paz, Estado de México, México.

CURP: GOPD931125MMCMDN00

Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia

Cédula Profesional: 9938349

Desarrollo académico

Cursó Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

Licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo

RESUMEN

HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA ENTRE *Cosmos atrosanguineus* Sherff y *Cosmos purpureus* (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl.

En la Universidad Autónoma Chapingo se desarrolla un programa de mejoramiento genético de especies mexicanas ornamentales, entre las que se encuentran especies del género *Cosmos* Sherff., destacando el cosmos chocolate (*Cosmos atrosanguineus* Sherff) endémico de México y usado en Europa como planta de jardín. El objetivo del presente trabajo fue realizar cruza manuales entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus* para generar híbridos que puedan ser registrados y comercializados en México. Las semillas híbridas obtenidas dieron origen a plantas que en el carácter color de flor, 50 % presentaron tonalidades parecidas al progenitor masculino mientras que el 50 % restante fue similar a la madre. Para el carácter forma de hoja el 100 % de las plantas híbridas presentaron hojas más parecidas al progenitor masculino. Sólo el 15 % de los híbridos presentó escasa esencia a chocolate. La naturaleza híbrida de los materiales obtenidos fue confirmada mediante marcadores moleculares tipo ISSR; se observaron relaciones genéticas más cercanas con el progenitor femenino debido a la naturaleza triploide de los híbridos. Este estudio demuestra que es posible realizar con éxito intercambio genético entre estas dos especies, para generar variedades con los mejores atributos morfológicos de ambas especies.

Palabras clave: Hibridación interespecífica, afinidad genética, ISSRs.

Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Autor: Diana Erika Gómez Pedraza
Director de tesis: Juan Martínez Solís

ABSTRACT

INTERSPECIFIC HYBRIDIZATION BETWEEN *Cosmos atrosanguineus* Sherff and *Cosmos purpureus* (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl.

A plant breeding program for ornamental Mexican species is being developed at the *Universidad Autónoma Chapingo*, among them are species of the genus *Cosmos* Sherff., highlighted by the chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.), which is endemic from Mexico and used in Europe as a garden plant. The objective of this work was to make manual crosses between *Cosmos atrosanguineus* and *Cosmos purpureus* to produce hybrids that can be registered and commercialized in Mexico. The hybrid seeds obtained generated 50 % plants with flower color character similar to the male parent while the other 50 % alike to the female. For the leaf shape character, 100 % of the hybrids plants presented leaves similar to the male parent. Only 15 % of the hybrids presented scarce essence to chocolate. The hybrid nature of the materials obtained was confirmed by ISSR molecular markers; due to the triploid nature of the hybrids, closer genetic relationships were observed with the female parent. This study shows that it is possible to carry out genetic exchange between these two species, to generate a variety with the best morphological attributes of both species.

Keywords: Interspecific hybridization, genetic affinity, ISSRs.

Thesis of Maestría en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo
Author: Diana Erika Gómez Pedraza
Advisor: Juan Martínez Solís

1. INTRODUCCIÓN

México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en biodiversidad de plantas con 30,000 especies distribuidas a lo largo del país, de las cuales el 50 % son endémicas de México (CONABIO, 2017). Una gran parte de estas especies pertenece a la familia de las asteráceas, con 362 géneros presentes en México (Villaseñor, 2004). El género *Cosmos*, perteneciente a esta familia, es uno de los grupos monofiléticos con gran número de especies endémicas en México: 33 especies y 4 variedades (Vargas *et al.*, 2013).

Una de estas especies es la conocida comúnmente como “cosmos chocolate” (*Cosmos atrosanguineus* Sherff.), la cual es una especie nativa de México que se distribuía, según las últimas colectas realizadas en los años 30, en los estados de Hidalgo y San Luis Potosí. Sin embargo actualmente se cataloga como una especie extinta en su medio natural, por lo que solo existen algunos ejemplares en jardines botánicos como en el de Kew, Inglaterra, y en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta especie tiene como atractivo el aroma a chocolate que se manifiesta en las flores. Sin embargo, es una especie autoincompatible, por lo cual no produce semillas. A nivel mundial existen variedades patentadas que se han generado mediante cruza interespecíficas, de las cuales ninguna se obtuvo en México, ni es comercializada ni aprovechada en el país. Por lo que en el presente estudio se hicieron cruza interespecíficas de *Cosmos atrosanguineus* con *Cosmos purpureus* con el objetivo de producir semilla botánica y generar nuevos híbridos que pudieran ser registrados y comercializados en nuestro país.

Objetivo general

Generar híbridos interespecíficos entre *Cosmos atrosanguineus* Sherff. y *Cosmos purpureus* que puedan ser registrados y comercializados en México.

Objetivos específicos

1. Comprobar la naturaleza híbrida de las F₁ obtenidas mediante el uso de marcadores moleculares de ADN.
2. Demostrar la identidad genética de una colecta realizada en Hidalgo y registrada como *Cosmos atrosanguineus*.

Hipótesis

Existe afinidad genética entre *C. atrosanguineus* y *C. purpureus*, lo que generará la formación de híbridos con atributos genéticos y morfológicos intermedios entre ambos progenitores.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Diversidad biológica del género *Cosmos*

Dentro de las angiospermas o plantas con flores, la familia *Asteraceae* es una de las más diversas y ampliamente distribuidas en México; algunos autores reportan que alrededor del 63 % de sus especies son endémicas del país (Vargas *et al.*, 2013).

Así, si se considera la tribu *Coreopsideae* (Less.) perteneciente a esta familia, 13 de los 24 géneros que la constituyen son endémicos de México. Más aún, 194 de sus 590 especies se encuentran en nuestro país (Vargas *et al.*, 2013).

Esta tribu se caracteriza por presentar cabezuelas con un involucre de 2 series filarias diferenciadas por color, consistencia y forma, canales resiníferos conspicuos en las filarias internas y la producción de pigmentos flavonoides (Funk *et al.*, 2009).

El género *Cosmos* Cav., perteneciente a la tribu *Coreopsideae* (Less.) es ejemplo de la amplia diversidad y endemismo de esta tribu en el país, siendo junto con los géneros *Bidens*, *Coreocarpus* y *Thelesperma*, uno de los grupos monofiléticos más diversos de la tribu (Crawford *et al.*, 2009).

El género *Cosmos* presenta las siguientes características: hojas opuestas, simples a pinnatisectas. Involucre subhemisférico; 2 series filarias, verde exterior, herbáceas, esparcidas, linear-lanceoladas. Flores liguladas blancas, amarillas, rosas, púrpura oscuro a rojo-púrpura; sus inflorescencias (cabezuelas) son muy vistosas, lo que las hace muy atractivas como flores de ornato. Discos florales fértiles, bisexuales, amarillos. Filamentos de la antera peludos. Aquenios de color marrón oscuro a negro, lineales, fusiforme-tetragonales, estrechándose en una punta delgada, mucho más alargada en las interiores, erectos o ligeramente curvados, 4 lóbulos en la sección transversal (Crawford *et al.*, 2009; Hind & Fay, 2003). Este género está formado por 37 especies diferentes y se distribuye en el

Norte, Centro y Sudamérica, su hábitat natural es el bosque mixto seco y rocoso de pino-encino localizado de 2,000 a 3,300 (Vargas *et al.*, 2013).

Algunas características destacables únicas del género *Cosmos* y que por lo tanto lo distinguen de otros géneros de *Coreopsideae*, es la pubescencia de los filamentos de los estambres y la alta variabilidad en la forma de las hojas, las cuales pueden ser desde las sencillas subespatuladas u hojas ovado-lanceoladas a muy profundamente pinnadas. Otra característica distintiva es la forma tetragonal de sus aquenios, con uno o dos surcos longitudinales en cada una de sus caras (Hind & Fay, 2003; Crawford *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2014).

El género *Cosmos* incluye hierbas anuales y perennes. La condición perenne ha sido lograda a través de dos mecanismos. En el primero, las raíces son fasciculadas en contraste con el segundo grupo donde la base del tallo es engrosada y leñosa y la raíz es axonomorfa (Rodríguez *et al.*, 2006).

El género se divide en 3 secciones: 1) *Cosmos* sección *Cosmos* Sherff., 2) *Cosmos* sección *Mesinenia* Sherff y 3) *Cosmos* sección *Discopoda* (DC.) Sherff.

Cosmos sección *Cosmos* agrupa 5 especies anuales con cabezuelas de 8 flores liguladas de color blanco, violeta o anaranjado y aquenios pubescentes de cuerpo alargado.

Cosmos sección *Mesinenia* incluye 8 especies sufruticosas que producen cabezuelas con 5-8 flores liguladas de color blanco, violeta o amarillo y aquenios pubescentes o glabros de cuerpo corto.

Por último, *Cosmos* sección *Discopoda* está representada por 22 especies de hábitos herbáceos, perennes, con raíces tuberosas, cabezuelas con 8-10 flores liguladas, blancas, violáceas o púrpuras y aquenios pubescentes o glabros de cuerpo exiguo (Hind & Fay, 2003; Vargas *et al.*, 2013).

Según Rodríguez *et al.* (2006), el género *Cosmos* en México agrupa 30 especies distintas (Taxón 1-30). Sin embargo, Castro *et al.* (2014) añaden otras 7 nuevas a este género (Taxón 31-37) es decir un total de 37 (Cuadro 1). En la Figura 1 se

muestra la variabilidad morfológica y de colores de las flores liguladas y del disco del género *Cosmos*.

Cuadro 1. Especies del género *Cosmos* distribuidas en México.

No.	Taxón	Distribución geográfica	Distribución geográfica en México
1.	<i>Cosmos atrosanguineus</i> (Hook.)	México	SLP, Hgo.
2.	<i>Cosmos bipinnatus</i> Cav.	EUA, México, Guatemala	Dgo, Sin, Nay, Zac, Ags, Gto, Jal, Mich, Méx, DF, PUE, Hgo, Chis.
	<i>Cosmos bipinnatus</i> Cav. Var. <i>Exaristatus</i> DC.	México	Mich.
3.	<i>Cosmos carvifolius</i> Benth.	México	Dgo, Sin, Nay, Jal, Mich.
4.	<i>Cosmos caudatus</i> H. B. K. var. <i>Caudatus</i>	México, América Central, Antillas, América del Sur	Jal, Col, Mich, Ver.
	<i>Cosmos caudatus</i> H. B. K. var. <i>Exaristatus</i> Sherff	México	Mich.
5.	<i>Cosmos concolor</i> Sherff	México	Dgo, Zac
6.	<i>Cosmos crithmifolius</i> H. B. K.	México, América Central	Sin, Nay, Gto, Jal, Mich, DF, Gro, Oax, SLP, Chis.
7.	<i>Cosmos deficiens</i> (Sherff) Melchert	México	Jal.
8.	<i>Cosmos diversifolius</i> Otto ex Knowles & Westc. Var. <i>Diversifolius</i>	México, Guatemala	Mich, Méx, Oax, SLP, Chis.
	<i>Cosmos diversifolius</i> Otto ex Knowles & Westc. Var. <i>dahlioides</i> (S. Wats.) Melchert	México	DF.
	<i>Cosmos diversifolius</i> Otto ex Knowles & Westc. Var. <i>pumilus</i> Sherff	México	Pue.
9.	<i>Cosmos intercedens</i> Sherff	México	Nay, Jal.
10.	<i>Cosmos jaliciensis</i> Sherff	México	Jal.
11.	<i>Cosmos juxtlahuacensis</i> Panero & Villaseñor	México	Oax.
12.	<i>Cosmos landii</i> Sherff var. <i>landii</i>	México	Jal.
	<i>Cosmos landii</i> Sherff var. <i>achalconensis</i> Melchert	México	Jal.
13.	<i>Cosmos langlassei</i> (Sherff) Sherff	México	Mich, Gro.
14.	<i>Cosmos longipetiolatus</i> Melchert	México	Jal.
15.	<i>Cosmos mattenfeldii</i> Sherff	México	Mich, Gro.
16.	<i>Cosmos mcvaughii</i> Sherff	México	Jal.
17.	<i>Cosmos microcephalus</i> Sherff	México	Méx.
18.	<i>Cosmos montanus</i> Sherff var. <i>montanus</i>	México	Dgo, Zac, Nay
	<i>Cosmos montanus</i> Sherff var. <i>pinnatus</i> Sherff	México	Nay.
19.	<i>Cosmos nelsonii</i> Rob. & Fern	México	Oax.
20.	<i>Cosmos ocellatus</i> Greenm. Var. <i>ocellatus</i>	México	Mor.
	<i>Cosmos ocellatus</i> Greenm. Var. <i>greenmanii</i> Sherff	México	Gro.
21.	<i>Cosmos palmeri</i> B. L. Rob. Var. <i>palmeri</i>	México	Dgo, Jal, Ags, Zac, SLP.

	<i>Cosmos palmeri</i> B. L. Rob. Var. <i>odontophyllus</i> Sherff	México	SLP.
22.	<i>Cosmos parviflorus</i> (Jacq.) Pers.	EUA, México	BC, Son, Chih, Sin, Dgo, Zac, Ags, Gto, Jal, Mich, Méx, DF, Pue, Oax, Hgo, SLP, Tamps. Chih, Dgo, Nay, Gto. Mor, Méx, Ver.
23.	<i>Cosmos pringlei</i> B. L. Rob.	México	
24.	<i>Cosmos purpureus</i> (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl. Var. <i>Purpureus</i>	México	
	<i>Cosmos purpureus</i> (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl. Var. <i>flavidiscus</i> Sherff	México	Méx.
25.	<i>Cosmos scabiosoides</i> H.B.K. var. <i>scabiosoides</i>	México	Zac, Nay, Jal, Mich, Méx, Mor, DF, Pue, Ver, Chis.
	<i>Cosmos scabiosoides</i> H.B.K. var. <i>oblongus</i> Sherff	México	Mich.
26.	<i>Cosmos schaffneri</i> Sherff	México	DF.
27.	<i>Cosmos sessilis</i> Sherff	México	Jal
28.	<i>Cosmos stellatus</i> Sherff	México	Mich
29.	<i>Cosmos sulphureus</i> Cav. Var. <i>sulphureus</i>	México, América Central	Son, NL, Sin, Dgo, Nay, Ags, Jal, Col, Mich, Gro, Méx, Mor, Oax, Chis.
	<i>Cosmos sulphureus</i> Cav. Var. <i>exaristatus</i> Sherff	México	Mor, Oax, Chis.
30.	<i>Cosmos linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl	México	Chih, Dgo, Nay, Jal, Mich.
	<i>Cosmos linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl var. <i>maysilessi</i> Sherff	México	Dgo.
	<i>Cosmos linearifolius</i> (Sch. Bip.) Hemsl var. <i>magnifolius</i> Sherff	México	Chih.
31.	<i>Cosmos pacificus</i> Melchert	México	Col, Gro, Jal, Méx, Mich, Sin.
32.	<i>Cosmos modestus</i> Sherff	México	Méx.
33.	<i>Cosmos nitidus</i> Paray	México	Méx.
34.	<i>Cosmos pseudoperfoliatus</i> Art. Castro, Harker & Aaron Rodr.	México	Jal.
35.	<i>Cosmos ramirezianus</i> Art. Castro, Harker & Aaron Rodr.	México	Jal.
36.	<i>Cosmos sherffii</i> Melchert	México	Oax.
37.	<i>Cosmos ochroleucoflorus</i> Melchert	México	Dgo, Jal, Nay.

Fuente: Sherff, 1932; Rodríguez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2014.



Figura 1. Variabilidad morfológica y de colores en las flores liguladas y del disco en el género *Cosmos*. A) *C. deficiens*; B) *C. mcvaughii*; C) *C. schaffneri*; D y K) *C. pacificus*; E) *C. palmeri*; F) *C. parviflorus*; G) *C. landii* var. *achalconensis*; H y NN) *C. sessilis*; I) *C. carvifolius*; J) *C. caudatus*; L) *C. diversifolius*; M) *C. peucedanifolius*; N) *C. bipinnatus*; O) *C. ochroleucoflorus*; P) *C. montanus*; Q) *C. pseudoperfoliatus*; R) *C. crithmifolius*; S) *C. intercedens*; T y II) *C. stellatus*; U) *C. sherffii*; V) *C. linearifolius*; W) *C. montanus*; X) *C. nitidus*; Y) *C. purpureus*; Z) *C. ramirezianus*; AA y GG) *C. sulphureus*; BB) *C. scabiosoides*; CC) *C. juxtlahuacensis*; DD y EE) *C. landii* var. *landii*; FF) *C. longipetiolatus*; HH) *C. mattfeldii*; JJ) *C. atrosanguineus*; KK) *C. jaliscensis*; LL) *C. concolor*; MM) *C. nelsonii*. Créditos Aarón Rodríguez (B, F, G, K, L, P, R, S, Y, DD, EE, JJ, NN); Arturo Castro-Castro (A, D, E, H, I, N, O-Q, V, Z, AA, BB, GG, II, KK, LL, TT); Francisco J. Santana-Michel (FF); Georgina Vargas-Amado (C, J, X, CC); Jesús G. González Gallegos (HH); Pablo Carrillo-Reyes (Q); Pilar Zamora-Tavares (U, MM). Fuente: Castro *et al.*, 2014.

2.2. *Cosmos atrosanguineus* Sherff.

Ubicación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Tribu: *Coreopsideae*

Género: *Cosmos*

Especie: *C. atrosanguineus*

Descripción botánica

Sherff (1932), transfirió a la especie *Cosmos atrosanguineus* de la sección *Candolle* del género *Bidens* a la sección *Discopoda* (DC.) Sherff del género *Cosmos*. Esta sección está conformada por especies perennes con raíces tuberizadas y la mayor parte presenta corolas violetas a marrón rojizo oscuro.

Una característica importante de la floración de la planta, que se omite en las descripciones científicas y ha llevado a la profusión de nombres comunes, es el intenso olor a chocolate de los capítulos.

La morfología de *Cosmos atrosanguineus* ha sido extensamente descrita por Hind & Fay (2003) como sigue. Esta especie presenta raíces tuberosas relativamente pequeñas, de 3 cm de largo por 1.5-3 cm de diámetro. Los tallos son relativamente pocos, ascendiendo algo curvos y probablemente decumbentes, generalmente retorcidos, más o menos hispídeos con pelos pluricelulares uniseriados en la parte baja de los tallos, pero glabros por encima.

Los brotes jóvenes vegetativos y florales a menudo tienen hojas pecioladas simples, pecíolos estrechamente alados, 2 cm de largo, verde rojizo oscuros por encima y por debajo, lámina de 4 cm de largo por 2 cm de ancho, elípticas, márgenes enteros, ápices agudos. Las hojas posteriores son conspicuamente pinnadas con 2 o 3 pares de folíolos en un raquis estrechamente alado y con un lóbulo simple conspicuo, el ápice del lóbulo es obtuso a redondeado, de 5 cm de largo por 2 cm de ancho.

La inflorescencia del capítulo terminal solitario y capítulos axilares en pedicelos alargados de 35-50 cm de largo (raramente de 60 cm), 2-4 mm de diámetro (a menudo irregularmente hueco) y reduciendo gradualmente su grosor desde la base a su parte más estrecha por debajo del involucro, brácteas muy estrechamente lanceoladas, de 1.5 cm de largo por 3 mm de ancho, de color púrpura oscuro, excepto hacia el ápice donde se vuelven verdosas. Los capítulos jóvenes suelen ser brillantes y sub-globosos y caracterizados por el ascenso de las filarias exteriores (brácteas involucrales), las cuales al principio son verde rojizo oscuro en los ápices, las filarias interiores encierran flores en desarrollo.

El capítulo es radiado, heterógamo, 4 cm de diámetro, conspicuo ya que casi todas las flores liguladas y la columna central de las flores están rodeadas por un anillo de palea de color marrón-rojizo oscuro; involucro en un principio amplio y superficialmente ciatiforme llegando a ser pateliforme (similar a un platillo) o casi plana, 2 cm de diámetro; filarias biseriadas, por un número igual; 10 filarias exteriores, dispersas, 10 filarias interiores, eventualmente con las mitades superiores curvadas entre las filarias exteriores; involucro ampliamente campanulado, pubescencia rizada por encima del primer pedicelo y rápidamente glabrescente; filarias exteriores de 9 mm de largo por 2.8-3 mm de ancho, algo dispersas, uniformemente verde a lo largo, filarias internas de 9-11 mm de largo por 3.5-4 mm de ancho, verde en la base y púrpura hacia los ápices, márgenes enteros, ápices agudos, a menudo redondeados; receptáculo plano a ligeramente convexo; palea 10-11 mm de largo por 2 mm de ancho, blanco verdoso en la base, de color marrón-rojizo oscuro en el tercio superior, medio tercio

oscureciendo gradualmente hacia el tercio superior de rosado a marrón-rojizo oscuro, márgenes enteros.

Generalmente la inflorescencia se constituye de ocho flores liguladas, uniseriadas, finalmente deciduas hacia la columna central de las flores del disco, el limbo de la flor ligulada de 15-20 mm de largo por 10 mm de ancho, obovadas, lobulación altamente variable, pero normalmente 2 o 3 lóbulos, con 3 venas prominentes (una por cada lóbulo), con demasiadas venas menores prominentes a lo largo del limbo, la lámina del limbo glabro, limbo al principio apareciendo negro por encima pero con toques de color rojo oscuro, tubo de la corola de 0.5 mm de longitud, moderadamente pubescente con largos pelos pluricelulares uniseriados glandulares; aquenio rudimentario.

Casi 40 discos florales (flores tubulares), hermafroditas, presumiblemente fértil en material original silvestre pero estéril en todo el material cultivado, tubo de la corola de 2 mm de largo, verde, porción baja glabra luego moderadamente pubescente con pelos pluricelulares uniseriados glandulares por encima, el cuello de la corola de 4-4.5 mm de largo, gradualmente extendiéndose a la base de los lóbulos de 0.8-1.5 mm de diámetro, verdoso en la base pasando abruptamente a través de un color rosa a un marrón-rojizo oscuro en la mitad superior, muy esparcidamente pubescente en la parte de afuera con pocos pelos glandulares, los lóbulos de la corola de 1 mm de longitud por 1 mm de ancho, generalmente triangular, ápices agudos, al principio con muchos pelos glandulares esparcidos, glabrescente en la madurez, superficie interior densamente papilada, a través de bandas marginales anchas con un área central lisa; anteras cilíndricas parcialmente exsertas del tubo de la corola, tecas de la antera de color café blancuzco, apéndices apicales de la antera estrechos en la base y expandidos dentro de un apéndice marginal ondulado de color café rojizo con un centro sólido de color café-blancuzco, apéndices de la antera basales muy cortos, los filamentos de la antera adjuntos a la base del tubo de la corola, glabros en la base pero moderadamente con pubescencia en el tercio medio con glándulas multicelulares uniseriadas rodeadas por pelos del ápice, glabros en el tercio

superior y constreñidos debajo del cuello de la antera, aplanado a lo largo; la base del estilo glabro y rodeado por un collar nectario, eje del estilo glabro, verde amarillento en la base llegando a ser marrón rojizo oscuro a aparentemente blanquizco en el ápice, brazos del estilo dispersos, marrón rojizo oscuro. Aquenios inmaduros e infértiles=estériles en material cultivado, de 13-20 mm de largo. Polen abundante de color amarillo.

Distribución geográfica

Sherff (1932) localizó el origen de la especie en la región Este-centro de México, desde San Luis Potosí hacia el sureste de Hidalgo, sugiriendo que la localidad original estaba cercana a Zimapán, Hidalgo. El hábitat donde se podría encontrar *Cosmos atosanguineus* es en bosque de pino y encino, zona en la que se encuentran muchas otras especies del género (Hind & Fay, 2003).

Rodríguez *et al.* (2006), señalan que en la actualidad no se ha encontrado a *Cosmos atosanguineus* en estado silvestre. Sin embargo, muestras del Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG) sitúan colectas de esta especie en los estados de San Luis Potosí e Hidalgo. Por otro lado, Castro *et al.* (2014), sugieren que la zona de distribución de esta especie también incluiría los estados de Querétaro y Guanajuato.

Protección de variedades

De acuerdo al catálogo de la International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV, 2015) se tienen registradas variedades nuevas de *Cosmos atosanguineus*, obtenidas principalmente por hibridación. Éstas se encuentran patentadas en diferentes países y sus nombres son: Pinot Noir, Coco Chanel, Hamsco, Hamcoec, Strawberry Choco Sanse 41, Cacao Choco Sanse 35, 3013/01, New Choco y Thomocha. (UPOV, 2015; Rice, 2017).

2.3. *Cosmos purpureus* (DC.) Benth & Hook. f. ex Hemsl

Ubicación taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Tribu: *Coreopsideae*

Género: *Cosmos*

Especie: *C. purpureus*

Descripción botánica

Cosmos purpureus (DC.) Benth & Hook.f. ex Hemsl pertenece a la sección *Discopoda* del género *Cosmos*. Las flores típicas de *C. purpureus* presentan tonalidades púrpura oscuro. Sin embargo se han reconocido tres variedades distinguibles por la coloración de las flores del disco. La var. *purpureus* con corolas de una coloración púrpura intenso. La var. *bicolor* Sherff presenta tonalidad púrpura oscuro en los lóbulos de la corola y el resto de la flor es amarilla. En contraste, en la var. *flavidiscus* la corola es de color completamente amarillo (Sherff, 1962).

En poblaciones de la var. *purpureus*, los pigmentos florales visibles se segregan de una manera que da como resultado individuos con las siguientes combinaciones de color: (1) la corola de color lavanda profundo y las flores del disco de color púrpura, (2) corola color lavanda y flores del disco amarillas y, (3) la corola color lavanda pálido a casi blanco y las flores del disco amarillas (Melchert, 1968).

La mayoría de los individuos de la var. *flavidiscus* tienen las hojas pinnadas con tres segmentos principales que apuntan hacia delante (especialmente el borde delantero de los segmentos laterales). En comparación, los segmentos de hojas de los demás tipos de colores florales en la colección indicada anteriormente de la var. *purpureus* son por lo general 5 en número y orientados perpendicularmente al eje principal de la hoja. En sus principales segmentos son regularmente dentadas o pinnadas (Melchert, 1968).

El número de cromosomas en la especie *C. purpureus* se ha definido en $2n=2x=24$ para los organismos diploides y $2n=4x=48$ para los tetraploides. Los individuos de la var. *flavidiscus* resultaron ser $n=12$, mientras que la var. *purpureus* es $n=24$. Por lo tanto, entre las poblaciones del Estado de México parece haber una base tanto cromosómica como morfológica para el reconocimiento de la var. *flavidiscus* a diferencia de las tres formas de corolas y discos de la var. *purpureus* (Melchert, 1968).

La especie *C. purpureus* fue descrita ampliamente por Sherff (1932) como se indica a continuación. Hierba perenne, tallo ascendente o erguido, raíces fasciculadas y tuberosas, 0.9-2.5 m de altura, tallo tetragonal, ranurado, púrpura, piloso, ramas glabras. Hojas pecioladas con el peciolo escasamente marginal 0.5-1.5 cm. Hojas con longitud de 5-9 cm y ancho de 4-8 cm. Contorno deltoide amplio, foliolos principales bipinnados 2 a 3 pares, membranosa, segmentos a menudo ovado-oblongos, ápice abruptamente estridente e inclinados hacia abajo, más 1-2 cm de largo y 5-14 mm. De color verde oscuro por encima y por debajo pubescente, márgenes escabrosos, la base cuneada.

Capítulos a menudo de 5-9, escasamente endados hasta 20 cm de longitud, se expanden en antesis de 3.8-4.3 cm de ancho y alrededor de 1.1-1.5 cm de altura. Brácteas exteriores del involucre campanuladas, 8 filarias, que se estrechan gradualmente, ápice estrecho pero no agudo, glabro, 3-5 nervaciones, 6-8 mm de longitud y 1-1.3 mm de ancho; filarias internas oblongo-lanceoladas, de crecimiento estriado, a menudo más pálidas que las filarias exteriores y se mantienen durante más tiempo. Flores liguladas aproximadamente 8, lígula

obovada, completamente púrpura o púrpura oscuro, 1.5-2 cm de largo y 7-9 mm de ancho; filamento de la antera de color púrpura muy oscuro, lineales de color marrón oscuro.

Aquenios delicadamente fusiformes, glabros, de color gris-marrón, redondo-tetraedrales, cada uno de las caras profundo-ranuradas, longitud del cuerpo aproximadamente de 12-13 mm de largo y 1.3-1.5 mm de ancho, paleas diáfanos con el ápice de color púrpura, 2 aristas, 2-3 mm de longitud.

A pesar de la información morfológica disponible de *C. purpureus* resulta difícil distinguirlo de *C. nitidus*, ya que los caracteres de hojas, filarias y flores liguladas son similares, difiriendo solamente en la longitud de los entrenudos, la segmentación y pubescencia de las hojas y la dimensión y márgenes de los folíolos. Adicionalmente, ambas especies crecen en simpatria en el sur del Estado de México (Castro, 2015).

Distribución geográfica

Las poblaciones de *Cosmos purpureus*, han sido ubicadas en la región Centro de México, principalmente en los estados de México, Morelos y Guerrero, formando parte de las vegetaciones de pino-encino (Rodríguez *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2014).

En el distrito de Temascaltepec, Estado de México fueron localizadas varias poblaciones de *C. purpureus*, esencialmente idénticas a las plantas citadas por Sherff (1962).

Adicionalmente se ha reportado la presencia de plantas con características morfológicas similares a la var. *purpureus* en la Sierra Madre del Sur de Guerrero (Melchert, 1968). Aunque su número cromosómico es desconocido, la morfología de sus hojas resulta intermedia entre las var. *purpureus* y var. *flavidiscus* localizadas en el Estado de México. Con el descubrimiento de la forma del disco amarillo en la var. *purpureus*, ahora se ha cuestionado que la especie endémica oaxaqueña *C. neisonii* realmente sea una especie distinta o sólo una variante de disco amarillo dentro de *C. purpureus* (Melchert, 1968).

2.4. Importancia del género *Cosmos* como planta ornamental

Son pocas las especies del género *Cosmos* que se encuentran bajo cultivo alrededor del mundo: *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss (cosmos negro, cosmos chocolate), *Cosmos bipinnatus* Cav. (Cosmos comunes, cosmos mexicanos) y *Cosmos sulphureus* Cav. (Cosmos amarillo o naranja) (Crawford et al., 2009).

Algunas semillas de *Cosmos bipinnatus* fueron colectadas durante la Expedición Real a Nueva España y llevadas a Madrid donde fueron cultivadas en el jardín botánico. Con base en estas plantas, el género fue descrito con este nombre aparentemente por la belleza de sus flores. En 1790, *Cosmos sulphureus* estaba en este jardín. Desde entonces estas especies anuales de *Cosmos* fueron apreciadas y propagadas en muchas partes del mundo y en el presente hay numerosas variedades y patentes en cultivo. *Cosmos atrosanguineus* (cosmos chocolate) y *Cosmos diversifolius* son especies perennes cultivadas pero no tan comunes. En México el uso ornamental bajo cultivo de *Cosmos* no es tan común como en otros países donde es costumbre sembrar plantas ornamentales anuales cada año (Rodríguez et al., 2006).

Cosmos chocolate es una planta comercializada en varios países del mundo, entre ellos destacan Japón, Nueva Zelanda, E.U.A, Inglaterra y países de la Unión Europea. Se ofrece en presentaciones principalmente como flor de maceta, aunque también como flor para jardín y flor de corte. Los precios van de 5 hasta 17 libras esterlinas en Inglaterra y de 3 hasta 19 euros en países de la Unión Europea (Harven, 2015), en Estados Unidos de América se comercializa con precios alrededor de los 7 dólares (Daves Garden, 2015).

2.5. Genética del género *Cosmos*

Dentro del género *Cosmos*, se han suscitado distintos eventos de aneuploidia y poliploidia que han dado lugar a diferentes números cromosómicos. Se ha observado que la mayoría de las hierbas anuales son diploides, a excepción de *C. caudatus* que es poliploide, mientras que en las hierbas perennes el 50 %

presentan poliploidía; de las 9 especies sufrútices 7 de ellas presentan alteraciones en su número cromosómico básico. Según Melchert (1968), debido a las variaciones cromosómicas se originó una dicotomía evolutiva, donde una de las ramas incluye a las secciones *Cosmos* y *Discopoda* mientras que la segunda a la sección *Mesinenia*. La sección *Discopoda* y *Cosmos* tienen un número básico de $X=12$, mientras que la sección *Mesinenia* presenta $X=11$ (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2017).

La ploidía dentro del género *Cosmos* sección *Discopoda* es muy variable. Por un lado se presentan especies diploides ($2n=2x=24$): *C. deficiens*, *C. juxtlahuacensis*, *C. mcvaughii*, *C. modestus*, *C. nitidus*, *C. ramirezianus*, *C. schaffneri*, *C. sessilis*, *C. sherffii* y *C. stellatus*. Mientras que otro grupo de especies son tetraploides ($2n=4x=48$) como: *C. atosanguineus*, *C. montanus*, *C. palmeri* y *C. pseudoperfoliatus*. En algunas especies como *C. purpureus*, *C. diversifolius* y *C. scabiosoides* existen poblaciones diploides ($2n=2x=24$) y tetraploides ($2n=4x=48$). Por su parte *C. jaliscensis* agrupa poblaciones tetraploides y hexaploides ($2n = 6x = 72$). *C. concolor*, es una especie hexaploide y por último *C. pringlei* es una especie octaploide ($2n = 8x = 96$). También se ha observado que las especies perennes normalmente presentan niveles de ploidía más elevados que las anuales (Castro, 2015; Castro *et al.*, 2017).

Las especies *Cosmos bipinnatus* y *Cosmos sulphureus*, pertenecientes al género *Cosmos*, han sido de las más estudiadas en cuestiones genéticas y de reproducción (Miyake *et al.*, 1926; Miyaque *et al.*, 1927; Little *et al.*, 1940; Crowe, 1954; Inazu & Mato, 1992, Oku, *et al.*, 2008). En el género *Cosmos* las flores del disco son hermafroditas, su antesis es centrípeta y el capítulo requiere en promedio de una semana para completar su desarrollo y funcionalidad. En *C. atosanguineus* se ha observado que los estigmas de las flores liguladas cuando son polinizadas se giran hacia abajo, característica observada en otros miembros de la familia de las asteráceas (Oku *et al.*, 2008).

De la familia *Asteraceae* se reporta un gran número de especies que presentan autoincompatibilidad. Ferrer & Good-Avila (2007) mencionan que de 571

especies de esta familia el 63 % de ellas son autoincompatibles, 10 % son parcialmente autoincompatibles y sólo el 27 % son autocompatibles.

La autoincompatibilidad genética (AI) en plantas está controlada por productos genéticos del locus S, que evitan la reproducción entre individuos que comparten uno o más alelos de AI. Se cree que este sistema ha evolucionado para evitar la autofertilización y la endogamia y así evitar los efectos nocivos de estos procesos (Ferrer & Good-Avila, 2007).

En los sistemas de autoincompatibilidad homomórfica gametofítica o esporofítica, el reconocimiento en el apareamiento de los alelos S maternos coincide con los expresados en las etapas de vida del polen. En los sistemas de autoincompatibilidad heteromórficos, la incompatibilidad impide los apareamientos entre individuos con la misma morfología (Busch & Schoen, 2008).

A pesar del control genético por los genes S, la plantas pueden mostrar variaciones en autocincompatibilidad debido a efectos ambientales en donde se presenta una desvinculación al locus S y la intervención de otros múltiples genes (Ferrer & Good-Avila, 2007).

Tanto en *C. bipinnatus* como en *C. atrosanguineus* se ha documentado el fenómeno de autoincompatibilidad esporofítica (Little *et al.*, 1940; Crowe, 1954; Lewendon, 2005; Oku *et al.*, 2008).

Lewendon (2005) encontró que *C. atrosanguineus* produce granos de polen con una viabilidad del 30 %. Al realizar autopolinizaciones y cruzas entre *C. atrosanguineus*, se encontró una fuerte incompatibilidad con cero granos de polen germinados por estigma. En contraste con autopolinizaciones y cruzas en *C. bipinnatus* y *C. sulphureus* que produjeron tres grupos de compatibilidad: 1) incompatible, 2) compatible y 3) semi-compatible. Se observó pseudo-auto-compatibilidad en *C. bipinnatus* pero no en *C. atrosanguineus*.

2.6. Mejoramiento genético de *Cosmos*

La hibridación interespecífica ha sido utilizada en diferentes especies ornamentales con el objetivo de transmitir características deseadas de las especies en cuestión a una sola planta. En los programas de mejoramiento genético es muy común la producción de plantas poliploides, especialmente triploides y tetraploides, buscadas por sus características destacables, como vigor alto y órganos florales grandes. Sin embargo, la mayoría de los híbridos F_1 resultan ser estériles tanto en gametos masculinos como femeninos. En especies ornamentales como Lili se ha encontrado esterilidad al realizar hibridaciones interespecíficas, la cual tiene dos causas. La primera es por una barrera de pre-fecundación, en la cual el polen germina pero el alargamiento del tubo polínico es detenido a la mitad de los canales del estilo. La segunda se debe a una barrera posterior a la fertilización, causada por la degradación de embriones híbridos y/o endospermo. Sin embargo ambas situaciones pueden ser superadas, una por la técnica de corte del estilo y la otra por rescate de embriones (Marasek-Ciolakowska *et al.*, 2018). Por otra parte, es posible lograr híbridos fértiles a través de la producción de anfidiploides mediante autoploidización somática (alodiploides). Para lo cual hay dos maneras de generar poliploidización, ya sea mitótica o meiótica. La primera es la duplicación del cromosoma por la vía mitótica que se realiza con agentes antimitóticos como orizalina y colchicina, los cuales inhiben la mitosis durante la metafase al interferir con la función de los microtúbulos y conduce a la producción de anfidiploides. La segunda alternativa es el uso de gametos $2n$ obtenidos mediante poliploidización meiótica. En *Lilium* es posible la formación de gametos $2n$ a través de la aplicación del gas óxido nitroso (N_2O) a las yemas florales. A pesar de que se ha reportado la producción natural de gametos $2n$ en algunas especies, la tasa de producción de éstos es baja (Marasek-Ciolakowska *et al.*, 2018).

En el género *Cosmos* se han encontrado individuos producto de la hibridación natural. Un ejemplo de ello es la cruce entre *C. carvifolius* y *C. linearifolius*, en la cual Melchert (1968), observó que los híbridos presentaban hojas simples y

capítulos con ocho flores liguladas como *C. linearifolius*, pero los segmentos de las hojas eran membranosos y filiformes como en *C. carvifolius*. Las flores del disco fueron translúcidas y similares a *C. carvifolius* pero su cantidad en cada capítulo fue semejante a *C. linearifolius*.

También se han encontrado híbridos interespecíficos entre poblaciones simpátricas de *C. carvifolius*, *C. crithmifolius* y *C. intercedens*, donde las plantas con morfología intermedia son comunes (Castro *et al.*, 2014).

Híbridos naturales resultado de la cruce entre *C. pacificus* y *C. sulphureus* son frecuentes y es común localizar poblaciones en simpatría con individuos de morfología intermedia (Castro *et al.*, 2014).

Se ha logrado realizar hibridaciones artificiales, como el caso de la cruce entre *C. caudatus* y *C. sulphureus* (Samata *et al.*, 1977) donde la descendencia obtenida de esta cruce fue estéril. Sin embargo, a través de aplicaciones de colchicina, se logró obtener una F₁ parcialmente fértil. En este caso los híbridos presentaron características morfológicas intermedias; durante la etapa vegetativa fueron más parecidos a *C. caudatus*, sin embargo, durante la etapa reproductiva se asemejaron más a *C. sulphureus* presentando las flores liguladas de color anaranjado. Después de seis generaciones, la progenie presentó una morfología vegetativa decadente y los individuos empezaron a desarrollar flores liguladas de color violáceo, típicas de *C. caudatus*.

Oku *et al.* (2008) produjeron exitosamente un híbrido entre *Cosmos atrosanguineus* x *Cosmos sulphureus*, usando la técnica de rescate de embriones. La planta híbrida resultante mostró un fenotipo intermedio para el color de flor, el cual fue rojo carmesí; además presentó raíces tuberosas como *Cosmos atrosanguineus*, así como tolerancia al calor y a la enfermedad del moho gris.

2.7. Caracterización molecular

La caracterización molecular es una técnica biotecnológica que ha apoyado ampliamente a la caracterización morfológica en la identificación de especies, cultivares e híbridos. Cada vez son más los trabajos de mejoramiento genético de ornamentales en los cuales se hace uso de marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares permiten analizar un número ilimitado de loci génicos, detectando altos niveles de polimorfismo. Los resultados obtenidos pueden tener diferentes usos como: conocer la variabilidad genética existente dentro y entre poblaciones, estimar las relaciones filogenéticas entre individuos distintas especies, construcción de mapas genéticos, realizar análisis de ligamiento, identificar secuencias, entre otros usos (Bonamico, 2004; Vicente y Fulton, 2005).

Marcadores moleculares de tipo ISSR

Los marcadores moleculares de tipo ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) son secuencias repetidas, de un di- o trinucleótido constituidas por 16 a 25 pares de bases. Estos marcadores amplifican fragmentos entre repeticiones de secuencias simples (SSR) o también llamadas microsatélites. (Rocha *et al.*, 2014).

Los marcadores ISSR se basan en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). El proceso de amplificación de fragmentos de ADN requiere que el iniciador encuentre entre dos secuencias repetidas cercanas una secuencia complementaria a su propia secuencia. Esta amplificación es realizada por la enzima ADN Taq-polimerasa. Los fragmentos amplificados son separados mediante electroforesis en geles de agarosa y son visualizados al teñirse con bromuro de etidio y documentarse bajo una fuente de luz ultravioleta.

Los ISSRs son marcadores dominantes, es decir, que al amplificar el ADN con secuencias de tipo ISSR se obtienen bandas amplificadas o la ausencia de ellas. La presencia de una banda indica que hay dominancia, sin discriminar entre un

homocigoto dominante o un heterocigoto, mientras que la ausencia de esa misma banda sugiere que se trata de un homocigoto recesivo (Rocha *et al.*, 2014).

Sin embargo, su uso presenta algunas ventajas: los iniciadores por ser largos se pueden exponer a temperatura más elevadas, lo cual permite mayor especificidad en la reacción, haciendo a las bandas más reproducibles, , no se requiere conocer la secuencia de ADN de los segmentos a amplificar, como es el caso en otros marcadores moleculares, producen una gran cantidad de polimorfismos aún en especies con alta homogeniedad genética, además la técnica de laboratorio es sencilla y de bajo costo (Falcón & Valera, 2007; Rocha *et al.*, 2014).

Por otra parte, este tipo de marcadores, presenta algunas desventajas: no son específicos ya que fragmentos del mismo tamaño son originados en regiones no homólogas, lo que puede distorsionar las estimaciones de similitud genética, teniendo que recurrir a la secuenciación de las bandas para conocer la naturaleza molecular de los polimorfismos (Rocha *et al.* 2014).

Extracción y purificación de ADN

La obtención de los ácidos nucleicos puros es vital para la ejecución de análisis por medio de PCR. Esta se realiza a partir de la exposición de los tejidos a temperaturas bajas muy extremas, ya sea con el uso de ultracongelador (-86 °C), o lo más común mediante el uso de nitrógeno líquido (-200 °C). El tejido se macera inmediatamente para fragmentar las células y liberar a los ácidos nucleicos.

Posteriormente es necesaria la purificación debido a que en la muestra obtenida no sólo están presentes el ADN y ARN, sino que también se encuentran, proteínas, polisacáridos, compuestos poli-fenólicos u otros contaminantes que interfieren con la amplificación. Uno de los métodos de purificación más usado es el del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), el cual fue diseñado por Murray y Thompson en 1980. Las células vegetales se lisan con el detergente iónico CTAB, que es el componente principal del amortiguador de extracción

conteniendo además EDTA, Tris-HCl, NaCl y 2-mercaptoetanol. Se forma un complejo insoluble con los ácidos nucleicos, el EDTA se une al magnesio con lo cual se disminuye la actividad de la desoxirribonucleasa. El Tris-HCl confiere a la solución la capacidad de amortiguar el pH, pues un cambio superior o inferior podría dañar el ADN. Hasta este punto se han roto las membranas de la célula y de los orgánulos, mitocondrias y los cloroplastos (Falcon y Valera, 2007). Se agrega cloroformo: alcohol isoamílico, para desnaturalizar las proteínas y separar la mezcla en dos fases, se conserva la fase acuosa, que es donde se encuentran los ácidos nucleicos, y se le agrega isopropanol frío para hacerlos precipitar. El posterior tratamiento con etanol al 70 % permite una mayor purificación y elución de los ácidos nucleicos de la sal residual. Como último pase se procede a adicionar enzima ARNasa para degradar el ARN y quedarse sólo con el ADN (Falcon y Valera, 2007).

Amplificación por PCR

Después de la purificación del ADN, se procede con la amplificación por PCR. Esta técnica consiste en sintetizar exponencialmente fragmentos de ADN, utilizando la enzima ADN Taq polimerasa, obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus* (Serrato *et al.*, 2014).

En un tubo se hace una mezcla de reacción, la cual contiene: el ADN purificado, la Taq polimerasa, los iniciadores, desoxinucleótidos (dNTPs), cloruro de magnesio (MgCl₂), agua grado biología molecular y una solución amortiguadora para mantener el pH adecuado para la síntesis (Serrato *et al.*, 2014).

La mezcla se somete a la repetición de varios ciclos a diferentes temperaturas (ciclo de PCR). La reacción de PCR inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 93-96 °C, con lo cual se rompen los puentes de hidrógeno que las unían, quedando separadas las hebras que servirán de para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN (Serrato *et al.*, 2014).

Los iniciadores se alinean a sitios específicos complementarios de las cadenas sencillas de la región que se va a amplificar, ocurriendo este proceso cuando la temperatura baja entre 40 y 60 °C, en este paso la temperatura se ajusta dependiendo del iniciador que se esté usando (Serrato *et al.*, 2014).

Posteriormente ocurre la síntesis, o llamada también extensión del ADN, de una nueva cadena en sentido 5' a 3', lo cual se logra mediante el incremento de la temperatura a 72 °C, debido que es la temperatura ideal para que la ADN polimerasa se una a los iniciadores y se comience la replicación. Durante la repetición sucesiva de estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias, generándose así una replicación exponencial que da lugar a millones de copias del fragmento seleccionado por el iniciador (Serrato *et al.*, 2014).

Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite la separación de los fragmentos amplificados producidos mediante PCR. Generalmente es realizada en geles de agarosa cuando no se requiere un alto poder de resolución, sin embargo también se puede usar geles de poliacrilamida, que implican procesos más complicados de elaboración y manipulación (Fierro, 2014).

El principio básico de esta técnica de separación es la combinación de fuerzas eléctricas y de fricción que permiten el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN. El desplazamiento es dado por un campo eléctrico, donde la carga negativa del ADN (resultado de la presencia de grupos fosfatos) lo obliga a desplazarse en un flujo contrario al cátodo (electrodo negativo) dirigiéndose hacia el ánodo (electrodo positivo). El ADN posa sobre un gel especial, como la agarosa, que tiene como características estructuras tridimensionales que simulan una malla, y que debido a la fricción provoca que las moléculas de mayor tamaño migren con más lentitud que las menores, las cuales migran a mayores distancias en el gel, permitiendo que las

diferentes moléculas se separen en función de su tamaño. Si existen muchos fragmentos de un mismo tamaño, éstos se agrupan entres sí formando una banda en el gel (Fierro, 2014).

Las muestras a analizar se colocan en distintos pozos del gel. En el primero y último de ellos se coloca un marcador de peso molecular que facilite la clasificación de las bandas obtenidas. Como amortiguador para la realización de la electroforesis, así como la preparación del gel se puede utilizar TAE (Tris-Acetato EDTA) o TBE (Tris-Borato EDTA) (Fierro, 2014).

Documentación de los geles

La visualización de los productos amplificados requiere el uso de un transiluminador de luz UV y equipo de fotografía para documentar la imagen del gel. Para ello previamente el gel debe ser con una solución de bromuro de etidio. El bromuro de etidio (BrEt) es un agente intercalante (se intercala entre las bases nitrogenadas), el cual provoca que los fragmentos sean fluorescentes y puedan ser visualizados al exponerlos a la luz ultravioleta. El BrEt absorbe luz ultravioleta de $\lambda \approx 300$ nm, y emite una luz anaranjada de 590 nm, mediante la cual se logra observar la posición y cantidad relativa del ADN en el gel tras la electroforesis (Fierro, 2014).

2.8. Uso de marcadores moleculares en caracterización de híbridos

Los caracteres morfológicos son el tipo de marcadores más ampliamente usados en la determinación y caracterización de híbridos generados por cruza ya sea intra o interespecíficas. Sin embargo, su uso y análisis se torna complicado para determinar la herencia genética de muchos de los caracteres morfológicos, debido a que el fenotipo está bajo un control genético complejo.

Así mismo, existen otras herramientas que permiten la determinación del parentesco entre progenitores y progenie de una manera más acertada, así, las tecnologías de secuenciación y los marcadores moleculares han sido usados en la evaluación de las relaciones genéticas entre plantas. Se ha demostrado que la

distancia genética es uno de los factores más importantes que influyen en la compatibilidad de las cruza en los procesos de hibridación (Kuligowska *et al.*, 2016).

En la familia de las asteráceas el uso de marcadores moleculares tipo ISSR ha permitido determinar relaciones genéticas entre progenitores e híbridos, así como la estimación de la variabilidad genética entre especies (Shafie *et al.*, 2011; Mejía *et al.*, 2015; Kuligowska *et al.*, 2016).

Rodríguez *et al.* (2013) usaron marcadores RAPDs e ISSRs para estimar la diversidad genética entre 7 especies del género *Cosmos*. Con los marcadores RAPD obtuvieron 91.7 % de polimorfismo y la diversidad genética fue de 0.33, mientras que con los de tipo ISSR se obtuvo 65.6 % de polimorfismo y 0.22 de diversidad genética. Estos resultados sugieren la presencia de una alta diversidad genética entre especies del género *Cosmos*. Adicionalmente, estos autores realizaron un análisis de conglomerados mediante el método de agrupamiento por ligamiento promedio no ponderado mediante el cual obtuvieron un dendograma en el que las 7 especies formaron dos grupos; el primero comprendió a las especies: *Cosmos sulphureus*, *Cosmos pacificus* y *Cosmos diversifolius*, mientras que el segundo se integró con las especies: *Cosmos purpureus*, *Cosmos crithmifolius*, *Cosmos bipinnatus*, y *Cosmos parviflorus*.

Mejía *et al.* (2015) comprobaron mediante marcadores ISSR la identidad genética de híbridos obtenidos de la cruce entre *Dahlia dissecta* x *Dahlia rupícola*, los cuales mostraron una combinación de los perfiles polimórficos de los progenitores.

En otras especies fuera de la familia *Asteraceae* también se ha logrado mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR determinar el parentesco entre especies e híbridos de rosa (Schanzer & Vagina, 2007).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal de *Cosmos atrosanguineus*

En el año 2004 el Jardín Botánico de Kew, Inglaterra, donó a través de la Universidad Nacional Autónoma de México vitroplantas del clon cultivado de *Cosmos atrosanguineus*, a la Universidad Autónoma Chapingo, México. Por lo que el material experimental del presente trabajo se obtuvo poniendo vitroplantas en un medio de multiplicación MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con tiamina ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), myo-inositol ($120 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), 6-bencilaminopurina (BA, $2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y ácido naftalenacético (ANA, $0.2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$). La multiplicación se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y Células Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

Por otra parte se realizó una colecta de material vegetal de plantas reportadas como pertenecientes a una forma silvestre de la especie *Cosmos atrosanguineus* en la Sierra de Zimapán en el Estado de Hidalgo. El material vegetal colectado fueron nudos, los cuales se desinfectaron con Tween 20, alcohol (50 %, 30 seg), cloro (10 % del producto comercial, 10 min), 2 enjuagues intermedios y un enjuague final con agua destilada estéril. A continuación los nudos fueron sembrados en el mismo medio de multiplicación MS mencionado anteriormente.

Tanto los materiales del clon como los de la especie silvestre fueron multiplicados por tres subcultivos consecutivos. Se obtuvieron brotes apicales vigorosos de 2 cm con al menos dos nudos y se colocaron en medio MS para enraizamiento suplementado con tiamina ($4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), myo-inositol ($120 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), fluoroglucinol ($50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), ácido 1-naftalenacético (ANA, $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) y ácido indol-3-butírico (AIB, $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), durante 21 días.

Los brotes que desarrollaron raíces con longitud de 4 cm, fueron llevados al invernadero para aclimatarlos en macetas de 4" que contenían peat moss + agrolita (1:1), cuya superficie fue cubierta con plástico durante 25 días para evitar la deshidratación; la cubierta plástica se fue retirando paulatinamente hasta

eliminarla por completo. Las plantas se mantuvieron en el invernadero hasta la floración.

3.2. Material vegetal de *Cosmos purpureus*

Durante el mes de marzo de 2016 se realizaron colectas de semillas de material silvestre de la especie *Cosmos purpureus* en el municipio de Taxco, Estado de Guerrero. El sitio de colecta se localizó en las coordenadas geográficas 18°35'06" N, 99°35'51" O, con una altitud de 2054 msnm.

Las semillas se sembraron en semilleros con peat moss + agrolita (1:1), y se colocaron en una cámara de germinación (25°C) durante 15 días. Los primeros 8 días las semillas fueron mantenidas bajo condiciones de oscuridad y los siguientes 7 días se proporcionó 8 horas de luz por día.

Las plántulas obtenidas a los 15 días después de la siembra fueron plantadas en macetas de 4" conteniendo como sustrato peat moss + agrolita (1:1). La primera fertilización se realizó a los 7 días después del trasplante y posteriormente se fertilizó una vez por semana con la fórmula triple 17, la cual se disolvió en el agua de riego. El riego se realizó diariamente hasta los 7 días después del trasplante, posteriormente se regó cada tercer día.

Adicionalmente se sembraron semillas con y sin testa en medio de cultivo base MS. Primero se realizó el proceso de desinfección utilizando Tween 20, alcohol (50 %, 30 seg), cloro (10 % del producto comercial, 10 min), 2 enjuagues intermedios y uno final con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron durante 24 horas en un matraz con agua destilada estéril cubriéndolas en su totalidad, para posteriormente retirar la testa de la semilla con una navaja estéril en una campana de flujo laminar y a continuación se sembraron en medio de cultivo base.

3.3. Hibridación interespecífica de *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus*

Tanto el clon cultivado de *Cosmos atrosanguineus* como las plantas obtenidas a partir de semillas de *Cosmos purpureus* presentaron su floración en el mes de octubre, por lo que se procedió a realizar las cruas manuales entre las dos especies. Se tomó como progenitor femenino a *C. atrosanguineus*, mientras que *C. purpureus* fue el donador de polen.

La polinización se realizó cuando el estigma de las plantas madre se encontraba receptivo. Las plantas madre se regaron cada tercer día y se fertilizaron 1 vez por semana con la fórmula triple 17 incorporada al agua de riego. Transcurridos 20 días después de la polinización se obtuvieron semillas, las cuales se cosecharon y almacenaron durante una semana a 4 °C.

Las semillas obtenidas mediante hibridación fueron sembradas en semilleros con peat moss + agrolita (1:1) humedeciendo diariamente el sustrato; el semillero fue colocado en una cámara de germinación a una temperatura de 4 °C. Posteriormente las plántulas se colocaron en macetas de 4" con el mismo sustrato. La primera fertilización se realizó a los 7 días después del trasplante y posteriormente se fertilizó una vez por semana con triple 17 incorporado en el agua de riego. Se regó diariamente hasta los 7 días después del trasplante, posteriormente se regó cada tercer día.

Las plantas de las dos especies y los híbridos se mantuvieron en los invernaderos del Posgrado de Horticultura del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.4. Extracción de ADN

Para extraer el ADN del clon cultivado de *Cosmos atrosanguineus* se colectaron hojas provenientes de explantes que habían sido introducidos a medio de cultivo base MS (Murashige & Skoog, 1962) con un mes de antelación.

El ADN de *Cosmos purpureus* se obtuvo de hojas y cotiledones provenientes de plántulas germinadas de semillas sin testa, en medio de cultivo base MS.

Las semillas producto de la cruce interespecífica entre *Cosmos atrosanguineus* (clon cultivado) y *Cosmos purpureus* se sembraron en macetas bajo condiciones de invernadero y originaron plantas híbridas. De éstas se tomaron nudos y se pusieron en medio de cultivo base MS durante 30 días, a partir de las cuales, se cortaron hojas para la extracción de ADN.

La extracción se realizó a partir de tejidos vegetales de plantas *in vitro* con el objetivo de garantizar su sanidad y evitar la contaminación por hongos presentes en las plántulas manejadas bajo condiciones de invernadero.

La extracción y purificación del ADN total se realizó a través del método CTAB (Murray y Thompson, 1980) en el Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

Se inició con la preparación del amortiguador de extracción con Tris-HCl 100 mM, EDTA-Na₂ 20 mM, NaCl 1.4 M, 2-Mercaptoetanol 10 mM, SDS 1.3 %, pH 8.0.

En microtubos de 1.5 mL, se agregó 600 microlitros del amortiguador para cada material vegetal y se precalentó a 65 °C en un termoblock.

El material vegetal se extrajo de los frascos con medio de cultivo a los cuales se les cortaron las hojas y cotiledones dependiendo del material disponible, se pesó 0.5 g por muestra y se colocaron en tubos de 1.5 mL, los cuales se almacenaron en un ultracongelador durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se sacaron los microtubos y se colocó el tejido vegetal en morteros estériles para macerar cada muestra por separado hasta obtener un polvo fino que se transfirió con una espátula al microtubo con el amortiguador precalentado haciendo una mezcla homogénea.

Se colocaron los microtubos nuevamente a 65 °C durante 20 min. Se retiraron del termoblock y se dejaron enfriar. Se centrifugaron a 21000 xg durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de 1.5 mL y se agregó un volumen

de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó. Se centrifugó a 12,000 xg durante 5 min. La fase acuosa superior se colocó en otro microtubo y se agregó 500 µl de isopropanol frío, agitando por inversión. Se colocaron a -20 °C durante 30 min. Se centrifugó a 12,000 xg por 5 min, y posteriormente se decantó el sobrenadante cuidando de no perder el precipitado y se escurrió.

Luego se agregó 700 µl de STE y se almacenó durante una noche a 4 °C para disolver los ácidos nucleicos. Se agitó suavemente al momento de retirarlo del refrigerador. Se agregó 4 µl de RNasa para eliminar el ARN, mezclando suavemente y se colocaron a 37 °C durante 1 hora. Se agregó 70 µl de acetato de sodio 3M y 700 µl de isopropanol frío, se agitó por inversión hasta obtener el precipitado de ADN y se almacenó a -20 °C durante 30 min.

Posteriormente se centrifugó a 8,000 xg durante 10 min, se decantó cuidando de no perder la pastilla correspondiente al ADN. Se agregó 500 µl de etanol al 70 % (grado reactivo), y se agitó hasta disolver las sales. Por último se centrifugaron los microtubos a 8,000 xg durante 10 min, se decantó y se escurrió sobre una toalla sanitaria, se secó por completo la pastilla, se disolvió en 80 µl de TE y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

3.5. Determinación de la cantidad y pureza del ADN

La cantidad y pureza del ADN de las muestras se midió con un espectrofotómetro Nanodrop Lite Thermo Scientific. La calidad del ADN se determinó realizando una reacción de PCR para amplificar el ADN con los iniciadores 16S1 y 16S2. La mezcla de reacción estuvo compuesta por H₂O grado biología molecular, dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración 500 µM), amortiguador de PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, iniciador 16S1 y 16S2 10 ng µL⁻¹, Taq ADN polimerasa 5 U µL⁻¹ y a cada tubo se le adicionó el ADN genómico obtenido de las muestras homogeneizado a una concentración de 10 ng µL⁻¹. Se hizo la separación de los fragmentos de los productos de PCR mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3 %, el voltaje aplicado fue de 100V durante 30 min. Transcurrido este tiempo el gel se tiñó con bromuro de etidio; para visualizar las bandas se colocó

el gel bajo la luz ultravioleta de un transiluminador DigiDoc-it® Imaging System y se documentó.

3.6. Obtención de patrones ISSR

Inicialmente se tomó una muestra al azar y se probaron 12 iniciadores ISSR (Sigma®) y se seleccionaron los 8 que presentaron el mayor número de bandas nítidas y con polimorfismo (Cuadro 2). Los segmentos de ADN se amplificaron mediante PCR en el termociclador Eppendorf modelo 5331. La mezcla de reacción incluyó los reactivos siguientes: H₂O grado biología molecular, dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP a una concentración de 500 µM), amortiguador de PCR 10X, MgCl₂ 50 mM, iniciador 10 ng µl⁻¹, Taq ADN polimerasa 5 U µl⁻¹ y el ADN genómico obtenido de las muestras homogeneizado a una concentración de 10 ng µl⁻¹. El programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización de 1 minuto a 93 °C; 40 ciclos de 20 segundos a 93 °C, 1 minuto a la temperatura de alineamiento recomendada para cada iniciador (Cuadro 2) y 20 segundos a 72 °C, concluyendo con un ciclo de extensión final de 6 minutos a 72 °C. Los amplicones fueron separados por electroforesis aplicando un voltaje de 100V durante 45 min, en un gel de agarosa al 1 % con amortiguador TAE (40 mM Tris acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para visualizar las bandas bajo la luz ultravioleta del transiluminador y se documentaron.

Cuadro 2. Iniciadores ISSRs utilizados, secuencia (5'-3') y temperatura de alineamiento utilizados para obtener patrones de bandeo de híbridos de *Cosmos atrosanguineus* x *Cosmos purpureus*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Ta °C
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	61
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	61
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58
ISSR4	(AG) ₈ CTC	58
ISSR5	(AC) ₈ CTA	56
ISSR6	(AC) ₈ CTG	58
ISSR7	(AG) ₈ CTG	58
LOL2	(CT) ₈ GC	56

Ta: Temperatura de alineamiento.

3.7. Análisis estadístico

Se construyó una matriz básica de datos (MBD) a través de la cuantificación del número de bandas producto de la amplificación; se asignaron valores binarios a las bandas en caso de presencia el valor de 1 y valor de 0 a la ausencia de cada banda por alelo.

Con la MBD se calcularon distintas medidas de similitud y distancia genética entre pares de muestras y distintos métodos de agrupamiento; finalmente se seleccionó la distancia de Jaccard (1-S) y el análisis de agrupamiento se realizó con el método de Ligamiento por Promedio Ponderado. Adicionalmente se realizó un análisis descriptivo de los diferentes iniciadores utilizados. Todos los análisis descritos se llevaron a cabo con el programa Infogen® (Universidad de Córdoba, Argentina).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Comprobación de la naturaleza híbrida de la progenie con marcadores moleculares

Para corroborar la naturaleza híbrida de la progenie obtenida a partir de hibridación manual entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus* se obtuvieron los perfiles moleculares de los progenitores y sus respectivos híbridos. En la Figura 1 se muestra el patrón de bandeo obtenido con el iniciador ISSR3. En ella puede apreciarse que los híbridos (carriles 3-5 y 7-9) presentan bandas correspondientes a ambos progenitores (carril 1: *C. atrosanguineus* y carril 2: *C. purpureus*). Estos resultados se observan también en el gel correspondiente al iniciador ISSR6 (Figura 2), lo cual permite corroborar la naturaleza híbrida de la progenie obtenida.

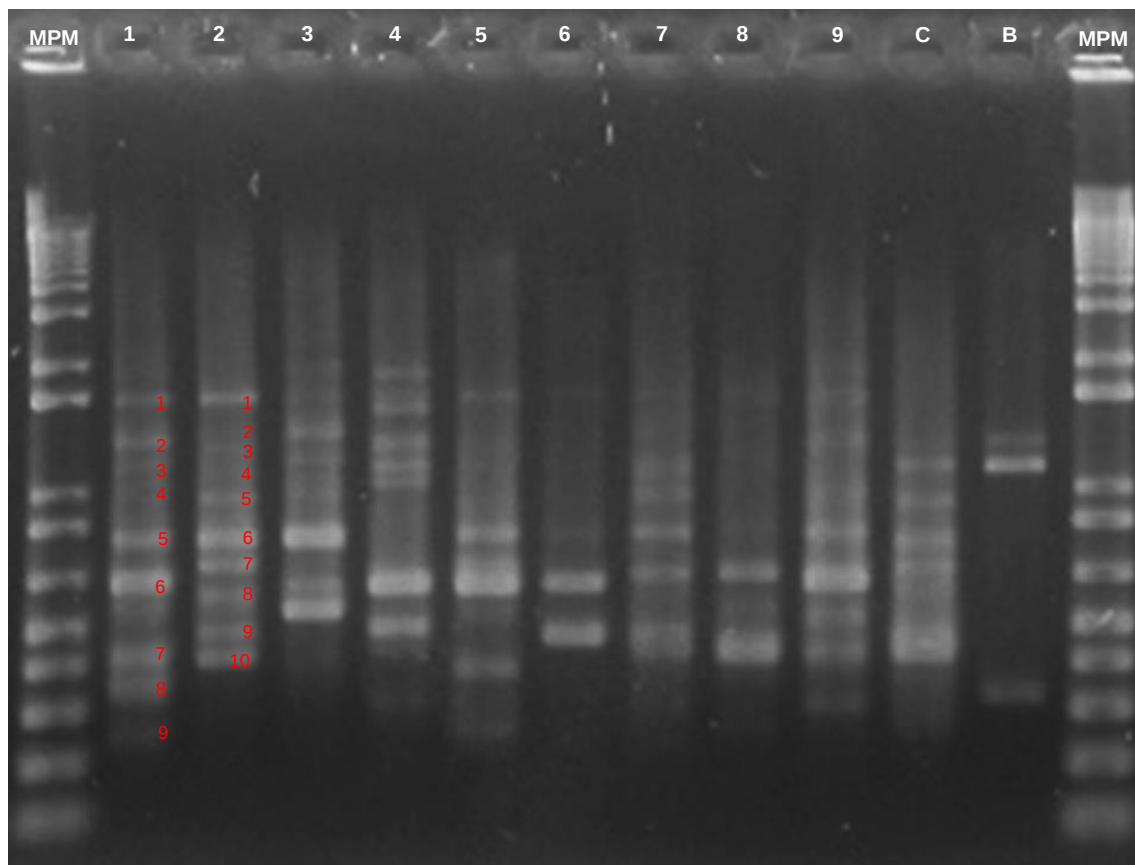


Figura 1. Perfiles moleculares de *Cosmos atrosanguineus* (carril 1), *Cosmos purpureus* (carril 2) y sus híbridos interespecíficos (carriles 3-5 y 7-9) obtenidos con el marcador de peso molecular.

Con el uso del marcador molecular ISSR3 (Figura 1), en el progenitor femenino se amplificaron 9 bandas, 8 de las cuales estuvieron presentes en al menos uno de los 6 híbridos. Para el progenitor masculino, 8 de las 10 bandas amplificadas se encontraron en al menos uno de los híbridos. De las nueve bandas amplificadas en *C. atrosanguineus*, cuatro de ellas no se presentaron en *C. purpureus* mientras que de las 8 bandas amplificadas en *C. purpureus* 5 de ellas estuvieron ausentes en el progenitor femenino, por lo que ambos progenitores sólo compartieron 5 bandas en común. En cuanto a la comparación de los perfiles moleculares de clon de Kew *C. atrosanguineus* (carril 1) y la colecta de Hidalgo de *C. atrosanguineus* (carril 6), se puede apreciar que son distintos, ya que sólo compartieron 3 de las 4 bandas amplificadas.

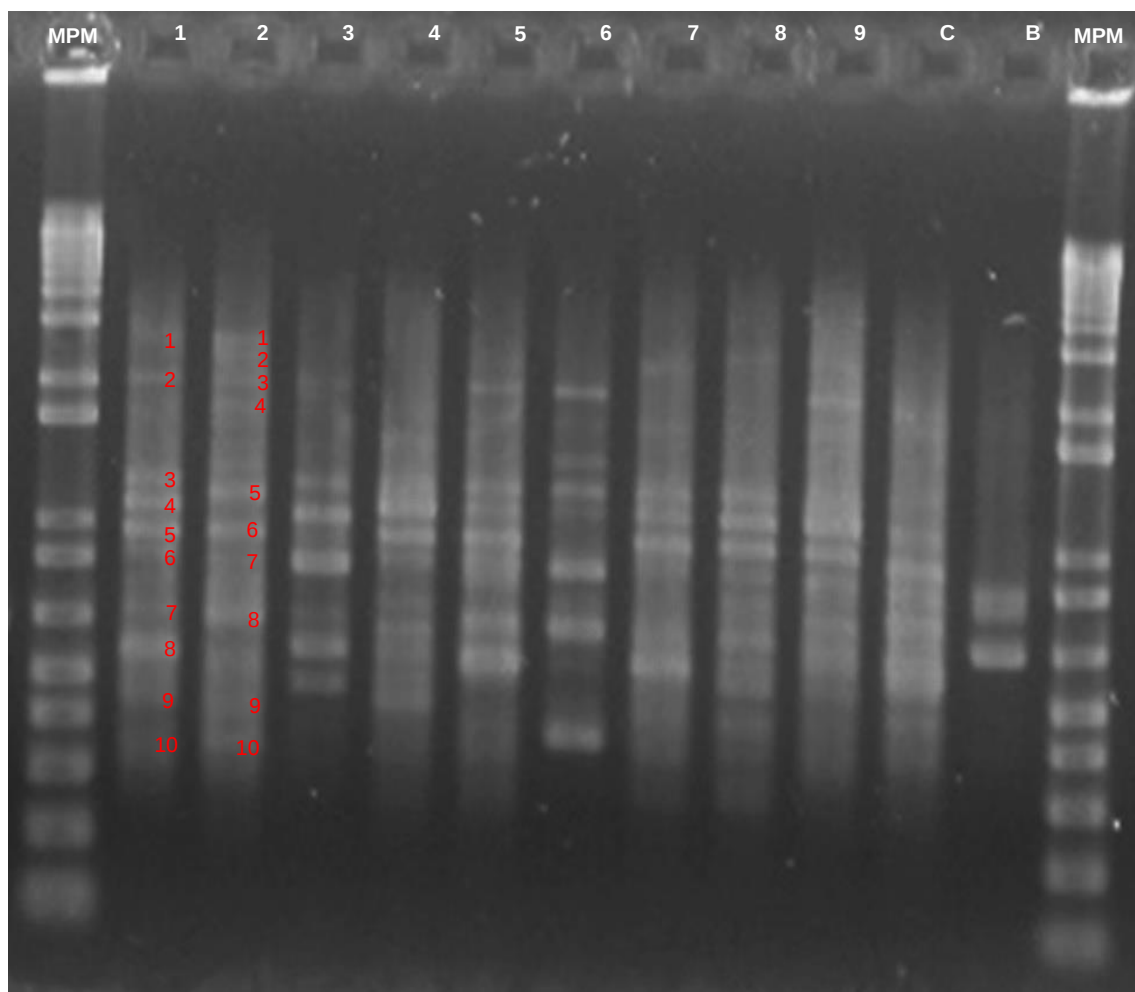


Figura 2. Perfiles moleculares de *Cosmos atrosanguineus* (carril 1), *Cosmos purpureus* (Carril 2) y sus híbridos interespecíficos (carriles 3-5 y 7-9) obtenidos con el marcador de peso molecular.

En la figura 2 se muestran las bandas amplificadas con el marcador molecular ISSR6; en el progenitor femenino se obtuvieron 10 bandas, todas ellas se encontraron en al menos uno de los 6 híbridos. Mientras que 9 de las 10 bandas amplificadas en el progenitor masculino, se presentaron en al menos uno de sus híbridos. De las 10 bandas amplificadas en *C. atrosanguineus* 5 de ellas no se presentaron el *C. purpureus*, mientras que de las 10 bandas obtenidas para éste, sólo 5 se observaron también en el progenitor femenino, por lo que entre las dos especies sólo se compartieron 5 bandas. De la misma manera que lo observado en la figura 1, los perfiles moleculares de *C. atrosanguineus* (clon) y *C. atrosanguineus* (Colecta Hidalgo, 10 bandas amplificadas), también fueron diferentes, ya que sólo compartieron 5 bandas en común de las 10 amplificadas. Por su parte Schanzer y Vagina (2007) también pudieron demostrar la hibridación natural interseccional en rosas mediante el uso de estos marcadores. En ese mismo estudio, comparando las especies *R. majalis*, y *R. canina*, el número de bandas amplificadas fueron de 59 y 61 respectivamente, de las cuales 49 bandas se encontraron estar compartidas entre ambas especies.

Cuadro 3. Bandas específicas de las especies *C. atrosanguineus* y *C. purpureus* y su correspondencia con el patrón de bandas de los híbridos.

	<i>C. atrosanguineus</i>	<i>C. purpureus</i>
Bandas específicas de la especie	30	27
Bandas específicas compartidas con híbridos	26	16
Híbridos con al menos una banda específica de la especie	4	3
Número de bandas específicas para cada híbrido compartidas con cada especie	M1: 18 M8: 16 M11: 15 M12: 12 M6: 11 M3: 9	M8: 10 M6: 8 M12: 7 M11: 6 M1: 5 M3: 4

En el cuadro 3 se muestra el número total de bandas específicas para cada especie obtenidas mediante el uso de los todos los iniciadores ISSR probados; es decir, bandas presentes en una de las especies y que están ausentes en la otra. En este cuadro puede apreciarse que los híbridos compartieron 86 % de las

bandas con *C. atrosanguineus*; mientras que para el progenitor masculino, *C. purpureus*, los híbridos sólo compartieron 59 % de sus bandas específicas. Resultados similares fueron encontrados en rosa por Schanzer y Vagina (2007), donde al comparar el número de bandas específicas de los progenitores *R. canina* (12) y *R. majalis* (10) con sus respectivos híbridos, encontraron que todos ellos mostraron las 12 bandas del progenitor femenino, mientras que sólo presentaron 4 del progenitor masculino. Los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con los reportados por Mejía-Muñoz *et al.* (2016), quienes mediante el uso de marcadores ISSR fueron capaces de demostrar el carácter híbrido de la progenie obtenida por cruzamientos manuales entre *Dahlia dissecta* y *Dahlia rupicola*.

4.2. Estimación de las relaciones genéticas entre materiales

Para estimar las relaciones genéticas entre los progenitores y su descendencia con la MBD se calcularon las distancias de Jaccard ($1 - S$) entre pares de materiales y se realizó un análisis de agrupamiento mediante el método de ligamiento por promedio ponderado. El dendrograma obtenido se presenta en la figura 4.

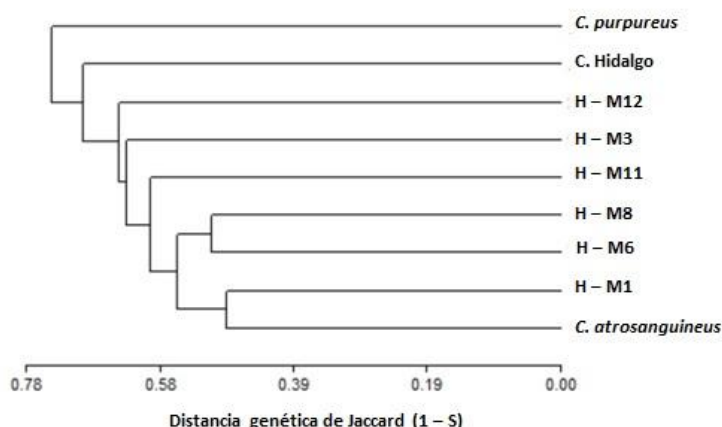


Figura 4. Dendrograma que muestra las relaciones genéticas entre *Cosmos atrosanguineus*, *Cosmos purpureus* y sus híbridos interespecíficos, obtenido mediante la distancia genética de Jaccard ($1 - S$) y el método de agrupamiento de ligamiento promedio ponderado.

En esta figura puede verse que los progenitores son los que se encuentran más alejados genéticamente entre sí ($d = 0.74$), mientras que los híbridos interespecíficos se encuentran más cercanos al progenitor femenino (*C. atrosanguineus*) que al masculino (*C. purpureus*). Estos resultados pueden explicarse debido a que de acuerdo con Castro (2015), *C. atrosanguineus* es una especie perenne, autoincompatible y tetraploide, mientras que *C. purpureus* es un material anual y diploide, de manera que los híbridos interespecíficos tienen dos dosis del genoma materno y sólo una del paterno, es decir, son triploides ($2n=3x=36$). Esto podría comprobarse realizando conteos cromosómicos con un citómetro o bien, observando si los híbridos interespecíficos llegan a producir semilla viable, ya que la presencia de tres juegos cromosómicos origina que los gametos que se producen durante la meiosis sean desbalanceados, lo cual a su vez ocasiona esterilidad (Marasek-Ciolakowska *et al.*, 2018).

La comparación de algunos caracteres morfológicos de los progenitores y sus híbridos interespecíficos corrobora las relaciones genéticas encontradas mediante los marcadores ISSR. Así, el color de la flor que se obtuvo en los híbridos, fue de 50 % de plantas con color de flores tendientes a *C. atrosanguineus*, mientras que el otro 50 % de plantas fue más similar a *C. purpureus*. En la figura 5 se muestran los colores típicos de las flores de *C. atrosanguineus* y *C. purpureus*. Los híbridos M-3 y M-12 (figura 6) presentaron tonalidades parecidas a *C. purpureus*, mientras que los híbridos M-6 y M1 (figura 7) presentaron tonalidades más cercanas a *C. atrosanguineus*.



Figura 5. Color de flor del clon de Kew de *Cosmos atrosanguineus* (izquierda) y de *Cosmos purpureus* (derecha).



Figura 6. Color de flor de los híbridos interespecíficos M-3 (izquierda) y M-12 (derecha).



Figura 7. Color de flor de los híbridos interespecíficos M-6 (izquierda) y M-1 (derecha).

Estos resultados están en concordancia con el dendrograma obtenido, ya que los híbridos M-6 y M-1 presentaron un color de flor más parecido a *C. atrosanguineus* y fueron los más cercanos genéticamente a este progenitor; mientras que los híbridos M-3 y M-12, los cuales en dendrograma se ubicaron más cercanamente a *C. purpureus*, mostraron colores de flor similares a éste. En el caso del carácter forma de las hojas, todos los híbridos obtenidos presentaron hojas simples y pinnadas trifoliadas, con los bordes aserrados, similares al progenitor masculino (Figuras 8 y 9).



Figura 8. Forma de las hojas de *Cosmos atrosanguineus* (izquierda) y *Cosmos purpureus* (derecha).



Figura 9. Forma de las hojas de los híbridos interespecíficos M-12 (izquierda) y M-1 (derecha). *Cosmos purpureus* se caracteriza por presentar una bifurcación en el pedúnculo floral (figura 10), la cual no se presenta en *C. atrosanguineus*. Todos los híbridos interespecíficos mostraron esta característica (figura 11).



Figura 10. Ramificación del pedúnculo de *Cosmos purpureus*, planta completa (izquierda) y acercamiento a la bifurcación (derecha).

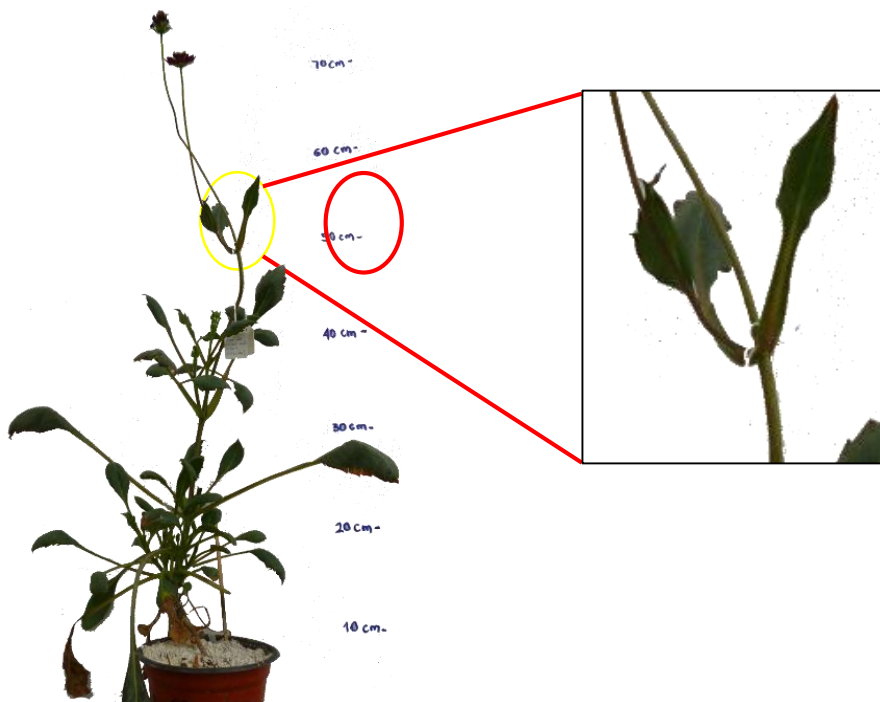


Figura 11. Ramificación del pedúnculo de los híbridos interespecíficos, planta completa (izquierda) y acercamiento a la bifurcación (derecha).

4.3. Demostración de identidad genética de clones silvestres de *C. atrosanguineus*

Debido a que la especie *Cosmos atrosanguineus* ha sido reportada como extinta de su medio natural (Rodríguez *et al.*, 2006), resultan estimulantes los reportes que afirman haber localizado ejemplares silvestres de esta especie. Por lo que uno de los objetivos del presente trabajo fue el corroborar que una colecta obtenida en la Sierra de Zimapán, en el estado de Hidalgo, podría tratarse de *Cosmos atrosanguineus*. Los patrones de bandas obtenidos con los distintos iniciadores ISSR usados en este estudio (Figuras 2 y 3) demuestran claramente que el clon proveniente del Jardín Botánico de Kew (carril 1) es distinto del material colectado en Hidalgo (carril 6). Adicionalmente, el análisis de conglomerados sitúa a la colecta de Hidalgo a una distancia genética de 0.69 con respecto a *C. atrosanguineus*. Los resultados obtenidos indican que el clon de Kew y la colecta de Hidalgo son genéticamente distintos. Estas diferencias probablemente se deban a que como el clon fue separado de su medio natural,

éste no presente la misma variación genética que el material silvestre, el cual ha estado más expuesto a cambios en su ambiente. Se han observado diferencias notables en el color de las flores de ambos materiales, ya que en los materiales silvestres se presentan tonalidades variadas que van del rosa oscuro al marrón oscuro, mientras que en el clon las flores son de color marrón oscuro; otra diferencia entre estos materiales es que la colecta de Hidalgo produce abundante polen mientras que en el clon ésta es escasa (Figura 12).



Figura 12. Color de flor de *C. atrosanguineus* clon de Kew (izquierda) y *C. atrosanguineus* procedente de Zimapán, Hgo (derecha).

4.4. Análisis de marcadores moleculares ISSR

Los perfiles moleculares obtenidos para los distintos materiales evaluados en el presente estudio mediante el uso de 8 iniciadores ISSR fueron utilizados para realizar una descriptiva de dichos marcadores. En el Cuadro 4 puede observarse que estos marcadores produjeron 134 bandas, de las cuales 128 fueron polimórficas (95 % de polimorfismo). Estos resultados fueron muy superiores a los obtenidos por Rodríguez-Bernal *et al.* (2013), quienes al utilizar ISSR para estudiar la diversidad genética de siete especies de *Cosmos* encontraron un polimorfismo únicamente del 65.6 %; aunque mediante el uso de RAPDs el nivel de polimorfismo encontrado aumentó al 91.7 %.

Cuadro 4. Número de bandas totales, polimórficas, proporción de loci polimórficos, contenido de información polimórfica, error estándar, porcentaje de amplificación y probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar obtenidos con ocho iniciadores ISSR's en dos especies de *Cosmos* (*C. atrosanguineus*: clon y silvestre; *C. purpureus*) y sus seis híbridos.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	BP	BM	BT	PMF(95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	16	0	16	1.00	0.23	0.02	16.67	4.2E-17
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	12	0	12	1.00	0.25	0.01	18.52	8.2E-21
ISSR3	(GA) ₈ CTC	23	1	24	0.96	0.25	0.02	31.48	8.8E-11
ISSR4	(AG) ₈ CTC	11	0	11	1.00	0.28	0.01	44.44	4.1E-13
ISSR5	(AC) ₈ CTA	17	2	19	0.89	0.28	0.01	46.78	3.7E-10
ISSR6	(AC) ₈ CTG	22	0	22	1.00	0.28	0.02	43.43	3.9E-12
ISSR7	(AG) ₈ CTG	12	2	14	0.86	0.29	0.01	40.48	2.1E-10
LOL2	(CT) ₈ GC	15	1	16	0.94	0.26	0.01	45.14	3.2E-10
Total		128	6	134				36.32	1.2E-99

Estas discrepancias podrían deberse a que estos autores usaron sólo cinco iniciadores, mientras que en el presente trabajo se evaluaron ocho de ellos. Los iniciadores ISSR6 e ISSR3 fueron los que amplificaron el mayor número de bandas (22 y 24, respectivamente). Sin embargo los iniciadores que presentaron el mayor contenido de información polimórfica (PIC) fueron el ISSR7 (29 %), seguido por los iniciadores ISSR4 (28 %), ISSR5 (28 %) e ISSR6 (28 %). Mientras que los iniciadores ISSR1 e ISSR2 fueron los que mostraron la mayor capacidad discriminatoria entre materiales al presentar la menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

En el presente trabajo los iniciadores conformados por una mayor proporción de A-C y A-G fueron los que proporcionaron el mayor polimorfismo, lo cual contrasta con lo reportado por Rodríguez-Bernal *et al.* (2013), quienes encontraron que los iniciadores con mayor proporción de G-C fueron los más polimórficos.

5. CONCLUSIONES

Se ha demostrado que es posible realizar con éxito hibridación interespecífica entre *Cosmos atrosanguineus* y *Cosmos purpureus* dado que se obtuvo semilla fértil, lo que hace posible desarrollar nuevas variedades comerciales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron la utilidad de los marcadores moleculares tipo ISSR para corroborar la naturaleza híbrida de progenies obtenidas por cruzamiento artificial, así como para demostrar la identidad genética de colectas de *Cosmos* silvestres.

Los híbridos obtenidos presentan una morfología intermedia entre los progenitores, lo que los hace interesantes para el mercado de plantas ornamentales en México.

La colecta de clones silvestres de Hidalgo manifiesta una separación molecular con el clon cultivado mantenido en la colección “Kew Botanical Garden”, lo que hace suponer que podría tratarse de plantas diferentes.

6. LITERATURA CITADA

- Bonamico, N.; Aiassa, J.; Ibañez, M.; Di Renzo, M.; Díaz, D. y Salerno, J. (2004). Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 33(2): 129-144.
- Busch, J. W. & Schoen, D.J. (2008). The evolution of self-incompatibility when mates are limiting. *Trends in Plant Science*, 13 (3): 128-136.
- Castro, A. (2015). Filogenia y evolución del género *Cosmos* (Asteraceae, Coreopsideae). Tesis Doctoral. Universidad de Guadalajara. México. pp: 1-210
- Castro, A., Vargas, G., Castañeda, J.J., Harker, M., Munguía, G., Santacruz, F. & Rodríguez, A. (2017). Números cromosómicos para tres especies de *Cosmos* sección *Discopoda* (Asteraceae, Coreopsideae), con notas citogeográficas. *Acta Botánica Mexicana*, 118: 41-52.
- Castro, A., Vargas, G., Harker, M., & Rodríguez, A. (2014). Análisis macromorfológico y citogenético del género *Cosmos* (Asteraceae, Coreopsideae), con una clave para su identificación. *Botanical Sciences*, 92(3), 363-388.
- Comisión Nacional para la Biodiversidad (CONABIO). (2017). La diversidad biológica de México. Recuperado de: http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html
- Crawford, D. J., Tadesse, M., Mort, M. E., Kimball, R. T., & Randle, C. P. (2009). Coreopsideae. En V. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy, & R. J. Bayer (Edits.), *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae* International Association for Plant Taxonomy. Austria, Viena. pp: 713-730.
- Crowe, L.K. (1954). Incompatibility in *Cosmos bipinnatus*. *Heredity* 8: 1–11.

- Daves, Garden. (2015). Chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*). Recuperado de: <https://davesgarden.com/guides/pf/go/29/#b>.
- Falcon I, L., & Valera, A. (2007). Extracción de ácidos nucleicos. *En* Ecología Molecular. Eguiarte, L.E., Souza, V., Aquirre, X. (comps). Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. México. pp. 499-515.
- Ferrer, M.M., & Good-Avila, S.V. (2007). Macrophylogenetic analyses of the gain and loss of self-incompatibility in the *Asteraceae*. *New Phytologist*, 173: 401–414.
- Fierro, F.F. (2014). Electroforesis de ADN. *En* Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A. y M. G. Rocha M. (comps). Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Distrito Federal, México. pp: 27-51.
- Funk, V., Stuessy, T., Sussana, A., & Robinson, H. (2009). Classification of *Compositae*. *En* V. Funk, A. Sussana, T. Stuessy, & R. Bayer (Edits.), Systematics, Evolution, and Biogeography of *Compositae* International Association for Plant Taxonomy. Austria, Viena. pp: 171-189.
- Harven, S. (2015). Chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*), flowers. Recuperado de: https://www.sarahraven.com/flowers/plants/perennialsplants/cosmos_atrosanguineus_chocolate.htm
- Hind, N. & Fay, M. F., (2003). *Cosmos atrosanguineus* *Compositae*. *Curtis's Botanical Magazine*, 20(1), 40-48.
- Hosoki, T., Kobayakawa, H., & Ohta, K. (2003). Micropropagation of chocolate cosmos (*Cosmos atrosanguineus*) by repeated division of nodes/axillary shoots and adventitious shoots from microshoots. *Acta Horticulturae*, 625: 261-264.

- Inazu, A. & Mato, M. (1992). Expression of color-controlling gene C in *Cosmos bipinnatus* Cav. in relation to the anthocyanin biosynthetic pathway. *Japanese Journal of Breeding*, 42: 605–613.
- Kuligowska K., Lütken H., & Müller R. (2016). Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta*, 244(1):1-17.
- Lewendon, S. (2005). Self-incompatibility in *Cosmos atrosanguineus*: a rare Mexican endemic species of Asteraceae. Tesis Doctoral. University of Greenwich. United Kingdom. pp: 1-404.
- Little, T.H., Kantor, J.H., & Robinson, B.A. (1940). Incompatibility studies in *Cosmos bipinnatus*. *Genetics* 25: 150–156.
- Marasek-Ciolakowska, A., Nishikawa, T., Shea, D., & Okazaki, K. (2018). Breeding of lilies and tulips. Interspecific hybridization and genetic background. *Breeding Science* 68: 35–52.
- Mejía, M.J., Flores, E.C., Peña, O.G., Alvarado, C. M., Gaspar, H.R. & Reyes, S.J. (2015). Interspecific Hybridization between *Dahlia dissecta* and *D. rupicola*. *Acta Hort.* 1087: 321-324
- Melchert, T. (1968). Systematic studies in the *Coreopsidinae*: cytotaxonomy of Mexican and Guatemalan Cosmos. *American Journal of Botany*, 55: 345–353.
- Miyake, K., Imai Y., & Tabuchi, K. (1926). On the inheritance of Cosmos. *The Botanical Magazine*, 479: 592–598.
- Miyake, K., Imai, Y., & Tabuchi, K. (1927). Genetic experiments with Cosmos. *Journal of the College of Agriculture, Imperial University of Tokyo* 9: 33–36.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.

- Murray, M.G. & Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Res*, 8: 4321-4325.
- Oku, T., Takahashi, H., Yagi, F., Nakamura, I., & Mii, M. (2008). Hybridisation between chocolate cosmos and yellow cosmos confirmed by phylogenetic analysis using plastid subtype identity (PSID) sequences. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3): 323-327.
- Ortega-Larrocea, M., Chávez, M., & Bye Boettler, R. (1997). Micropropagación y establecimiento *ex vitro* de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. *Amaranto*, 10: 1-9.
- Quiala, E., Montalvo, G., & Matos, J. (2004). Empleo de la biotecnología vegetal para la propagación de cactáceas amenazadas. *Biotecnología Vegetal*, 4(4): 195-199.
- Rice, G. (2017). The story of *Cosmos atrosanguineus*. *Plant Origins*, pp: 112-119.
- Rocha M., M. G., González G., A., & Aguirre D., X. (2014). ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) y regiones intermedias entre secuencias simples repetidas (ISSRs). En Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A. y M. G. Rocha M. (comps). Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Distrito Federal, México. pp: 101 – 125.
- Rodriguez, A., Harker, M., Quezada-Solís, A., & Casillas-Gaeta, S. (2006). Diversidad y potencial ornamental del género *Cosmos* Cav. (Asteraceae) en Jalisco. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, pp: 610-619.
- Rodríguez, B.A., Piña, E. J., Vázquez, G.L., & Arzate, F.A. (2013). Genetic diversity of *Cosmos* species revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 12(4): 6257-6267.

- Samata, Y., Inazu, K., & Takahashi, K. (1977). Studies on the interspecific hybrid between *Cosmos sulphureus* and *C. bipinnatus* with special reference to flower color and pigments. *Japanese Journal of Breeding* 27: 223–236.
- Schanzer I.A. & Vagina A.V. (2007). ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) markers reveal natural intersectional hybridization in wild roses [*Rosa* L., sect. *Caninae* (DC.) Ser. and sect. *Cinnamomeae* (DC.) Ser.]. *Wulfenia*, 14: 1–14.
- Serrato, D.A., Flores, R.L., Aportela, C.J., & Sierra, P.E. (2014). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *En Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A. y M. G. Rocha M. (Comps.). Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Distrito Federal, México. Págs: 53-73.
- Shafie, M., Zain S., Zain, A., & Shah, R. (2011). RAPD and ISSR markers for comparative analysis of genetic diversity in wormwood capillary (*Artemisia capillaris*) from Negeri Sembilan, Malaysia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(18): 4426-4437.
- Sherff, E. E. (1932). Revision of the Genus *Cosmos* (Vol. 8). Field Museum Publications in Botany. Chicago, U.S.A.
- UPOV (International Union for the Protection of New Varieties of Plants). (2015). Proyecto: *Cosmos*. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Ginebra, Suiza. pp: 1-31
- Vargas, A.G., Castro, C.A., Harker, M., Villaseñor, J.L., Ortiz, E. & Rodríguez, A. (2013). Distribución geográfica y riqueza del género *Cosmos* (*Asteraceae*: *Coreopsideae*). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 536-555.
- Vicente, M.C. & Fulton, T. (2005). Tecnología de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Institute for Genomic Diversity, Cornell University. U.S.A.

- Villaseñor, J. (2004). Los géneros de plantas vasculares de la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 75: 105-135.
- Wilkinson, T., Wetten, A., Prychid, C., & Fay, M. (2003). Suitability of cryopreservation for the longterm storage of rare and endangered plant species: a case history for *Cosmos atrosanguineus*. *Ann Bot.*, 91(1): 65-74.